



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de la papa (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) para el control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Junior Jair CARO CASTRO

ASESOR

Jorge LEÓN QUISPE

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Caro, J. (2016). *Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de la papa (Solanum tuberosum sp. andigena) para el control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 12:15 horas del 09 de diciembre de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de JUNIOR JAIR CARO CASTRO.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 023-EAPMP-2016, el titulando expuso su tesis: "CAPACIDAD ANTAGONISTA DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: sobresaliente con mención.....

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo a JUNIOR JAIR CARO CASTRO y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 13:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 09 de diciembre de 2016.

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
(PRESIDENTE)

Mg. JORGE LEON QUISPE
(ASESOR)

Dr. JAIME SÁNCHEZ VENEGAS
(MIEMBRO)

Blgo. AUGUSTO DE LA CRUZ CALVO
(MIEMBRO)

Dedico esta tesis a mis padres a mis padres Kelly y Freddy, y a mis hermanos Michelle, Freddy y Gabriel, por su amor incondicional durante mis cinco años de estudio. Sé que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza. Solo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.

Agradecimientos

A Dios por haberme dado la alegría de la vida, con la convicción de saber que siempre se encuentra a mi lado y que me da la fuerza para superar todo obstáculo.

A mis padres, Kelly y Freddy, por todo su amor, paciencia y dedicación y comprensión, por haberme apoyado siempre para poder alcanzar todas las metas que me había trazado. Muchísimas gracias por todo lo brindado a mi persona y espero seguir brindándoles muchas más alegrías en el futuro.

A mis hermanos, Michelle, Freddy y Gabriel, por todo su cariño y apoyo. Gracias a ustedes por brindarme sonrisas todos los días en casa, y en especial en esos días que llegaba preocupado o cansado y me liberaban de mi estrés.

A mi asesor, Jorge León, por toda la confianza hacia mi persona durante el tiempo de realización de mi trabajo, por su orientación y apoyo en todas las etapas, y por todo el tiempo que me ha brindado para la culminación de este trabajo; así como también a mi jurado, los profesores Abad Flores, Jaime Sánchez y Fernando de la Cruz, por sus consejos en la etapa final de la revisión de este trabajo.

A mis amigos universitarios de toda la vida, Joe, Lucas, Alejandra y Oscar. Gracias por todos esos momentos compartidos en toda nuestra estancia académica. Valoro mucho las fortalezas que cada uno de ustedes poseen y que me han ayudado mucho en mi deseo de superación.

A mis amigos tesistas del laboratorio, Claudia, Jessica, Ula, Abigail y Pamela. Todos nosotros hemos compartido la misma pasión por el trabajo de investigación con nuestros adorados actinomicetos, y puedo decir que junto con los demás chicos del laboratorio fuimos como una segunda familia.

Finalmente, agradecer a todo aquel que en alguna forma ha contribuido a la realización y culminación de este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. La rizósfera	4
2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	4
2.3. Características generales de los actinomicetos	5
2.3.1. Clase Actinobacteria	5
2.3.2. Orden Actinomycetales	6
2. 4. Revisión del género <i>Streptomyces</i>	7
2.4.1. Generalidades taxonómicas	7
2.4.2. Morfología, estructura fina y ciclo de vida	8
2.4.3. Ecología	9
2.4.4. Temperatura y pH	10
2.4.5. Aislamiento y cultivo	10
2.4.6. Diferenciación de especies dentro del género <i>Streptomyces</i>	12
2.5. Compuestos bioactivos producidos por <i>Streptomyces</i> sp.	14
2.5.1. Metabolitos secundarios	14
2.5.2. Enzimas extracelulares	15
2.5.3. Metabolitos con capacidad antagónica	15
2.6. La papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	17
2.7. Problemas por los que atraviesa el cultivo de papa	18

	Pág.
2.8. Hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de papa	19
2.8.1. Fusariosis o pudrición seca	20
2.8.2. Rizoctoniasis o costra negra	21
2.8.3. El tizón tardío de la papa	22
2.8.4. Pudrición negra del tubérculo	23
2.9. Uso de microorganismos antagonistas para el control biológico de hongos fitopatógenos de la papa	24
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3.1. Hipótesis	27
3.2. Objetivos	27
3.2.1. Objetivo general	27
3.2.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Materiales	29
4.1.1. Colecta del material vegetal de estudio	29
4.1.2. Cepas de hongos fitopatógenos	29
4.2. Métodos	29
4.2.1. Lugar de toma de muestras y transporte al laboratorio de trabajo	29
4.2.2. Aislamiento de actinomicetos de suelo	29
4.2.3. Selección de colonias de actinomicetos	30
4.2.4. Caracterización fenotípica de los aislamientos	30
4.2.4.1. Caracterización morfológica	30
4.2.4.2. Caracterización bioquímica	31
4.2.5. Caracterización fisiológica de actinomicetos	32
4.2.5.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura	32
4.2.5.2. Rango de crecimiento en función del pH	32

	Pág.
4.2.6. Conservación de los cultivos puros de actinomicetos	32
4.2.7. Reactivación de hongos fitopatógenos	33
4.2.8. Prueba de antagonismo en placa	33
4.2.9. Obtención del extracto orgánico	33
4.2.10. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos	34
4.2.11. Análisis estadístico	34
4.2.12. Caracterización microscópica de los actinomicetos con mayor actividad antifúngica	34
4.2.13. Análisis del ADNr 16S de los actinomicetos aislados con mayor actividad antifúngica	35
4.2.13.1. Extracción de ADN	35
4.2.13.2. Amplificación del ADNr 16S por PCR	35
4.2.13.3. Confirmación de PCR	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Selección de colonias de actinomicetos	37
5.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos	37
5.2.1. Caracterización morfológica	37
5.2.2. Caracterización bioquímica	38
5.3. Caracterización fisiológica de los actinomicetos	47
5.3.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura	47
5.4.2. Rango de crecimiento en función del pH	49
5.4. Prueba de antagonismo en placa	52
5.5. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos	57
5.6. Análisis estadístico	60
5.7. Caracterización microscópica del actinomiceto AND 24	62
5.8. Análisis del ADNr 16S del actinomiceto AND 24	63

	Pág.
6. DISCUSIÓN	66
7. CONCLUSIONES	76
8. RECOMENDACIONES	77
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
10. ANEXOS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- CONAM: Consejo Nacional del Ambiente
- PGPR: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
- CIP: Centro Internacional de la Papa
- ATCC: American Type Culture Collection
- PBI: Producto Bruto Interno
- ISP: International Streptomyces Project
- ITS: Espaciador interno transcrito
- m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar
- L: Litro
- mL: Mililitro
- μ L: Microlitro
- kg: Kilogramos
- mg: Miligramos
- μ g: Microgramo
- mm: Milímetros
- UFC: Unidades Formadoras de Colonia
- p/v: Peso sobre Volumen
- v/v: Volumen sobre Volumen
- AAC: Agar Almidón Caseína
- APD: Agar Papa Dextrosa
- CMC: Carboximetilcelulosa
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- ANOVA: Análisis de Varianza
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características macroscópicas de las colonias de actinomicetos en Agar Almidón Caseína incubado a 28°C por 15 días	39
Tabla 2. Prueba de asimilación y utilización de carbohidratos por los actinomicetos	41
Tabla 3. Características de la cepa AND 24 en los diversos medios del <i>International Streptomyces Project</i>	42
Tabla 4. Producción de enzimas hidrolíticas para el uso de polisacáridos por los actinomicetos	46
Tabla 5. Porcentaje de eficiencia de crecimiento de actinomicetos a diferentes temperaturas con respecto al control (28 °C) a los 15 días	48
Tabla 6. Porcentaje de eficiencia de crecimiento de actinomicetos a diferentes pHs con respecto al control (pH 7) a los 15 días	50
Tabla 7. Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa frente a hongos fitopatógenos	53
Tabla 8. Síntesis de resultados de la capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa frente a hongos fitopatógenos	57
Tabla 9. Aspectos químicos de los solventes orgánicos utilizados	58
Tabla 10. Extracto orgánico obtenido de la cepa AND 24	58

	Pág.
Tabla 11. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de la cepa AND 24	59
Tabla 12. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de varianza (ANOVA) para porcentaje de inhibición	61
Tabla 13. Subconjuntos homogéneos - DHS de Tukey generales (Hongos fitopatógenos frente a porcentajes de inhibición)	61
Tabla 14. Intervalos generales de confianza al 95% ((Hongos fitopatógenos frente a porcentajes de inhibición)	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cultivos puros de cuatro cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de cultivos de papa	37
Figura 2. Observación microscópica de un microcultivo de actinomicetos con formación de filamentos en espiral	38
Figura 3. Indicador purpura de bromocresol a diferentes pHs	40
Figura 4. Porcentajes de actinomicetos aislados en relación a la utilización de azúcares utilizados por cada cepa	40
Figura 5. Actividad amilolítica de los actinomicetos en Agar Almidón revelada con lugol	45
Figura 6. Actividad celulolítica de los actinomicetos en Agar Mandels y Reese revelada con rojo de congo al 1%	45
Figura 7. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a 4 °C	47
Figura 8. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a 20 °C	47
Figura 9. Porcentaje de crecimiento de los actinomicetos en función de la temperatura	49

	Pág.
Figura 10. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a pH 5,5	51
Figura 11. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a pH 8,5	51
Figura 12. Crecimiento de los actinomicetos en función del pH.	52
Figura 13. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a <i>Fusarium</i> sp. en Agar Papa Dextrosa	54
Figura 14. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a <i>Lasiodiplodia</i> sp. en Agar Papa Dextrosa	54
Figura 15. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a <i>Rhizoctonia solani</i> en Agar Papa Dextrosa	55
Figura 16. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a <i>Phytophthora infestans</i> en Agar Centeno	56
Figura 17. Porcentaje de cepas con capacidad antifúngica según el número de fitopatógenos con los que presenta actividad positiva	57
Figura 18. Actividad antifúngica del extracto obtenido con etil acetato del actinomiceto AND 24 frente a <i>Lasiodiplodia</i> sp.	59
Figura 19. Actividad antifúngica del extracto obtenido con butanol del actinomiceto AND 24 frente a <i>Fusarium</i> sp.	60

Figura 20. Imagen del Microscopio Electrónico de Barrido del actinomiceto

AND 24 63

Figura 21. Árbol filogenético del ADNr 16S de la cepa AND 24 y 24 secuencias
de actinomicetos 65

RESUMEN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo más consumido a nivel mundial, en el que están involucrados más de 600 000 agricultores de 19 departamentos del Perú y ve disminuir su rendimiento debido a los altos costos de los fertilizantes químicos, problemas fitosanitarios y el deterioro de los suelos. En el presente trabajo se buscó determinar la capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de plantaciones de papa colectadas en la localidad de Andahuaylas - Región de Apurímac, frente a cuatro hongos fitopatógenos de importancia agrícola: *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans*. Se aisló 49 cepas de actinomicetos, en su mayoría caracterizadas fenotípicamente como *Streptomyces* sp. El 69,4% (34) de estas cepas inhibió el crecimiento del hongo *Fusarium* sp., el 44,9% (22) presentó capacidad antagonica frente a *Lasiodiplodia* sp., el 55,1% (27) fue antagonista contra *Rhizoctonia solani* y el 46,9% (23) frente a *Phytophthora infestans*; mientras que el 38,8% (19) demostró ser antagonistas contra los cuatro hongos evaluados. Se observó que el crecimiento de los actinomicetos se ve fuertemente influenciado por las bajas temperaturas y pHs bajos. Los extractos orgánicos de la cepa AND 24 obtenidos con diclorometano y etil acetato revelaron actividad antifúngica frente a *Lasiodiplodia* sp., mientras que el extracto butanólico mostró actividad antifúngica frente a *Fusarium* sp. El análisis filogenético del gen del ADNr 16S reveló que el actinomiceto en cuestión es probablemente *Streptomyces sampsonii*. Se concluye que los actinomicetos rizosféricos de la papa son excelentes productores de compuestos bioactivos capaces de inhibir notablemente el desarrollo de hongos fitopatógenos, por lo que se considera como potenciales candidatos a ser utilizados en programas de control biológico de plagas que afectan la papa.

Palabras claves: Rizobacterias, hongos fitopatógenos, papa, biocontrol de plagas, antagonismo.

ABSTRACT

Potato crop (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth growing more consumed worldwide and there are more than 600 000 farmers in 19 departments of Peru involved in this activity; but its yield is decreasing because the high cost of fertilizers, phytosanitary issues and soil deterioration. In this study the aim was to determine the antagonistic actinomycetes capacity isolated from the rhizosphere of potato fields collected in the town of Andahuaylas, Apurimac, against four fungal pathogens of agricultural importance: *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans*. 49 actinomycetes strains were isolated, a lot of them characterized phenotypical like *Streptomyces* sp. 69,4% (34) strains inhibited the growth of the fungus *Fusarium* sp., 44,9% (22) had antagonistic activity against *Lasiodiplodia* sp., 55,1% (27) was antagonist against *Rhizoctonia solani* and 46,9% (23) against *Phytophthora infestans*; while 38.8% (19) proved to be antagonists to the four fungi evaluated. It was determined that the growth of actinomycetes is strongly influenced by low temperature and low pH. Crude extracts of the AND 24 strain obtained with dichloromethane and ethyl acetate revealed antifungal activity against *Lasiodiplodia* sp., and the butanol extract showed antifungal activity against *Fusarium* sp. Phylogenetic analysis of 16S rDNA revealed that the actinomycete is probably *Streptomyces sampsonii*. In conclusion, the actinomycetes from the rhizosphere of potato are excellent producers of bioactive compounds that are able to inhibit the development of pathogenic fungi, so they can be considered as potential candidates for use in biological control of potato pests and diseases.

Keywords: Rhizosphere, phytopathogenic fungi, potato, biological control, antagonism.

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los diez países megadiversos en el mundo. Su diversidad de climas y pisos altitudinales han permitido el desarrollo de complejos ecosistemas donde habitan diversas especies de flora y fauna, pero además han favorecido al hombre, permitiéndole cultivar numerosas plantas domesticadas, de las cuales, la principal es la papa (*Solanum tuberosum* L.), de la que se conocen más de 3000 variedades en el país (CONAM, 2001).

La papa es el cuarto cultivo más consumido en el mundo luego del trigo, maíz y arroz, a los que supera en el valor nutricional. Nuestro país ocupa el puesto 19 entre los principales países productores de papa en el mundo. Su valor económico representa el 8% del PBI agropecuario y están involucrados más de 600000 agricultores de 19 regiones del país. Las regiones con mayor producción de papa se ubican en la sierra y costa del Perú, siendo estos Puno, Huánuco, La Libertad y Junín, lugares donde aún se llevan a cabo prácticas de cultivo rudimentarias (Ministerio de Agricultura, 2011).

El cultivo de *Solanum tuberosum* se encuentra expuesto a una serie de factores limitantes, tales como la baja calidad de los tubérculos, el empobrecimiento del suelo, el uso indiscriminado de agroquímicos, así como la presencia de plagas de insectos y organismos fitopatógenos, los cuales traen como consecuencia la disminución de la eficiencia, productividad y rentabilidad del cultivo (Rico, 2009). La práctica del cultivo de papa a nivel mundial es una de las actividades agrícolas en las que se realiza un alto uso de agroquímicos, debido a que se encuentra expuesto al ataque de numerosas plagas y patógenos, la mayoría de las cuales se incrementa en condiciones de alta humedad. Varias de estas sustancias químicas usadas con frecuencia son tóxicas para el agricultor, el propio cultivo y el medio ambiente (Ramírez *et al.*, 2014). Para que un agroquímico aplicado resulte efectivo, se deben considerar ciertos puntos, tales como el conocimiento del patógeno, la biología de la

enfermedad y la resistencia a las enfermedades. Durante décadas, pocas veces se han tenido en cuenta los factores más importantes en la aplicación de agroquímicos, los cuales han conllevado a la aparición de resistencia en los microorganismos (Juárez *et al.*, 2010).

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a los cultivos de plantas, como pueden ser los virus, hongos, bacterias, nemátodos y viroides, el grupo que más enfermedades ocasiona son los hongos, y por lo tanto, es sobre el que más investigaciones se vienen realizando. A nivel mundial, los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año (Cristóbal *et al.*, 2013). Se tiene conocimiento que alrededor de 8000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas (Camargo *et al.*, 2000). Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo, y una especie de este fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (Rodríguez, 2001). *Solanum tuberosum* es afectado por numerosos hongos fitopatógenos, entre los cuales los más importantes son *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Alternaria solani* (Reinoso *et al.*, 2007, Pérez *et al.*, 2015).

Hoy en día, se viene apostando por el uso de microorganismos antagonistas para el control de hongos fitopatógenos en los diversos tipos de cultivo, reduciendo de esta manera el uso de métodos químicos que provocan un impacto ambiental negativo y que posteriormente pueden inducir a la aparición de resistencia (Marín *et al.*, 2013).

En este último aspecto, en los últimos años se viene estudiando a microorganismos de vida libre que se localizan en la rizósfera de las plantas, los cuales producen metabolitos capaces de inhibir el desarrollo de organismos fitopatógenos, confiriendo protección frente a la infección por estos agentes (Franco-Correa, 2009; Cano, 2011).

Entre los microorganismos más importantes, tenemos a los actinomicetos, y en especial a los del género *Streptomyces*; puesto que tiene la capacidad de sintetizar antibióticos, los cuales presentan actividad antagonista contra hongos fitopatógenos, tales como *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. sin ocasionar efectos tóxicos a las plantas (Sadeghi *et al.*, 2006).

Si bien es cierto que se tiene grandes avances en este campo a nivel mundial, en nuestro país son pocos los trabajos de investigación que se han realizado sobre estos temas. En el caso de la papa, tenemos los aportes realizados por Rico (2009) sobre cepas de *Azotobacter* sp. y actinomicetos productores de compuestos bioactivos; los de Calvo y Zúñiga (2010) quienes demuestran la capacidad antagónica de cepas del género *Bacillus*; y los de Pérez *et al.* (2015) quien aísla actinomicetos de compost con capacidad antagonista frente a diversos fitopatógenos, y entre ellos a los hongos.

Con el presente estudio se pretende contribuir con el conocimiento actual que se tiene sobre cepas nativas que poseen capacidad antagonista con potencial para su uso como controladores biológicos de hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de papa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La rizósfera

Los suelos son el mayor reservorio de la biodiversidad en la tierra. Ellos son hábitats importantes para muchos procariotas y eucariotas. La diversidad de procariotas en el suelo ha sido estimada a un valor cercano a tres veces más grande que todos los demás ecosistemas naturales de la tierra combinados. Las poblaciones microbianas localizadas en el suelo no se distribuyen al azar, sino que dependen de muchos factores como son la composición del suelo, la cantidad de material orgánico, el agua, el pH y la disponibilidad de oxígeno. La raíz de las plantas superiores son las que poseen uno de los más grandes e importantes ecosistemas del suelo, el cual se denomina rizósfera (Hinsinger *et al.*, 2009).

La rizósfera se define como el volumen de suelo que se encuentra influenciado por la presencia de las raíces de una planta, cuya extensión varía en función del tipo de suelo, la especie de planta, entre otros factores (Killian *et al.*, 2001). Esta zona se caracteriza por poseer un alto nivel de actividad microbiana debido a los nutrientes secretados por las raíces en forma de exudados solubles como ácidos orgánicos y aminoácidos. Gracias a su eficiente sistema de absorción y catabolismo de sustancias orgánicas, estas bacterias son capaces de obtener el máximo beneficio de los exudados radicales (Tilak *et al.*, 2005).

2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Conocidas por sus siglas en inglés como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), son un grupo de bacterias que colonizan la raíz y estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. El mecanismo por el cual promueven el desarrollo de las plantas aún no se ha establecido por completo, pero comprende la habilidad de producir o cambiar la concentración de fitohormonas, la fijación asimbiótica de nitrógeno, el antagonismo contra microorganismos fitopatógenos,

producción de sideróforos, solubilización de fosfato mineral y otros nutrientes (Rico, 2009).

El efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas por parte de este grupo bacteriano puede darse de forma directa, por la utilización de ciertos metabolitos producidos por las bacterias como reguladores de crecimiento; o de forma indirecta, debido a que un grupo de estos metabolitos denominados determinantes antagónicos actúan inhibiendo el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, actuando de esta manera como un control biológico natural (Calvo y Zúñiga, 2010).

Dentro de este grupo bacteriano, se encuentran los géneros *Agrobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* y algunos representantes del Orden de los actinomicetos (Gupta *et al.*, 2015).

2.3. Características generales de los actinomicetos

2.3.1. La Clase Actinobacteria

La clase Actinobacteria *sensu stricto* comprende 15 ordenes, 43 familias y 203 géneros. Los miembros que se encuentran dentro de esta categoría muestran una variada morfología, la cual comprende formas esféricas denominadas cocos (tales como *Micrococcus* sp.), bacilos cortos (por ejemplo *Mycobacterium* sp.), bacilos irregulares (como los del género *Mycetocola*), bacilos grandes (característicos del género *Brevibacterium*) y formas miceliales que se fragmentan en elementos similares a cocos y bacilos (como *Nocardia* sp.). Otros muestran una mayor diferenciación morfológica que van desde aquellos que producen hifas ampliamente ramificadas que llevan esporas (como las observadas en el género *Micromonospora* sp.) a los que forman un micelio ramificado estable que lleva hifas aéreas, las que se diferencian en

cadenas cortas o largas de esporas (por ejemplo *Streptomyces* sp.). En general, las esporas no son móviles (Goodfellow *et al.*, 2012).

Dentro de los procariotas, los miembros de la clase Actinobacteria, y en particular las cepas del género *Streptomyces*, son la fuente más rica de productos naturales, especialmente los antibióticos clínicamente útiles y agentes antitumorales (Olano *et al.*, 2009). Las actinobacterias filamentosas producen aproximadamente el 45% de todos los metabolitos microbianos secundarios bioactivos (Berdy, 2005). A pesar de esta sorprendente diversidad metabólica, se ha estimado que solo alrededor del 10% del total de productos naturales que pueden ser sintetizados por estos organismos han sido descubiertos (Watve *et al.*, 2001).

Las actinobacterias están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres, incluidos los hábitats extremos como sedimentos de aguas profundas y suelos de desiertos hiperáridos (Leiva *et al.*, 2004). Son particularmente comunes en terrenos en el que tienen papeles en la transformación de la materia orgánica y moléculas recalcitrantes. Otros son patógenos de animales y plantas (como los géneros *Actinomadura*, *Mycobacterium* y *Nocardia*), simbioses formadores de nitrógeno (por ejemplo *Frankia* sp.) y simbioses de plantas y el tracto gastrointestinal de animales (como *Bifidobacterium* sp). Existe una gama de procedimientos para el aislamiento selectivo de componentes específicos de las comunidades de actinobacterias presentes en ambientes naturales, de acuerdo a que es lo que se busque estudiar (Goodfellow, 2010).

2.3.2. El Orden Actinomycetales

Este taxón es uno de los 15 órdenes clasificados en la Clase Actinobacteria. La mayoría de los integrantes de este orden son Gram positivos, bacilos no móviles rectos o ligeramente curvados, algunos de los cuales tienden a formar filamentos ramificados de hasta 1 mm de diámetro. La facilidad de la fragmentación de los

filamentos produce formas bacilares o cocoides. Las colonias pueden ser filamentosas dando una apariencia micelial, pero no se da la formación de un verdadero micelio aéreo. La mayoría de especies producen colonias blancas o grises predominantemente, mientras que ciertos grupos pueden desarrollar colonias pigmentadas de color rojo oscuro, rojizo, marrón, rosa o amarillento (Singh *et al.* 2012).

La mayoría de sus miembros son anaerobios facultativos, con algunas excepciones. El dióxido de carbono estimula el crecimiento de muchas especies. La reducción del nitrato varía entre géneros y especies. Todos los miembros de este grupo son quimioorganótrofos. Los productos finales de la fermentación de la glucosa incluyen ácido acético, láctico y succínico, con alguna variación en las cantidades de estos ácidos producidos por miembros de diferentes géneros (Gonzales *et al.*, 2010).

2. 4. Revisión del género *Streptomyces*

2.4.1. Generalidades taxonómicas

Comprende especies aeróbicas, Gram positivas, las cuales forman un substrato micelial ampliamente ramificado que rara vez se fragmenta. En la madurez, el micelio aéreo forma cadenas de tres a más esporas. Las esporas son inmóviles. A menudo, inicialmente las colonias muestran una superficie lisa, pero luego desarrollan un micelio que puede parecer granulado, pulverulento o aterciopelado. Pueden producir una amplia variedad de pigmentos responsables del color del substrato y del micelio aéreo (Manteca y Sánchez, 2010).

Son quimiorganótrofos con un tipo de metabolismo oxidativo. Dentro de sus características particulares, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Generalmente reducen los nitratos a nitritos y degradan sustratos poliméricos tales como caseína, gelatina, hipoxantina y almidón. La mayoría de especies utilizan una amplia gama de compuestos orgánicos como

fuentes únicas de carbono para proveerse de energía e incentivar su crecimiento (Ezziyyani *et al.*, 2004). La temperatura óptima para la mayoría de especies está en el intervalo de 25-35 °C; algunas especies, sin embargo, pueden crecer a temperaturas dentro de los rangos psicrófilos y termófilos. El intervalo de pH óptimo para el crecimiento es de 6,5-8,0. Se encuentran ampliamente distribuidas y son abundantes en el suelo, incluyendo el compost (Salazar *et al.*, 2014). El contenido de G+C dentro del ADN es de 66-78% (Gonzales *et al.*, 2010).

2.4.2. Morfología, estructura fina y ciclo de vida

El complejo ciclo de vida de *Streptomyces* sp. ofrece tres características para la caracterización microscópica detallada: A) Micelio vegetativo o substrato, B) Micelio aéreo que contiene las cadenas de artrosporas y C) Las artrosporas en sí mismas. Estas dos últimas categorías han proporcionado información de diagnóstico para los taxonomistas. Los primeros informes indicaron que estos actinomicetos formaban cadenas de esporas en el micelio vegetativo, tanto en cultivo sólido o líquido. Sin embargo, nunca se aclaró si estas estructuras eran análogas a las artrosporas formadas en el micelio aéreo en vez de deformaciones de las hifas producidas en cultivos viejos. A partir de ahí, la estructura fina de las artrosporas se estudió ampliamente. Ahora se conoce que las artrosporas están formadas por la tabicación y desarticulación de hifas pre-existentes dentro de una vaina fibrosa fina. La pared de la espora es formada, al menos en parte, a partir de capas de la pared de la hifa de los padres, desarrollo denominado holotático, el cual es típico para muchos actinomicetos (Hasani *et al.*, 2014).

La configuración de las cadenas de esporas ha jugado un papel muy importante en las descripciones de las especies en muchos años. Se sabe que un número de diferentes genes están involucrados en la formación de esporas, y que las diferentes condiciones de cultivo pueden tener una influencia en la formación de esporas. La gama de

morfologías de cadenas de esporas es extensa y actualmente se tienen diversas categorías de clasificación, agrupadas en lo que se conoce como grupos morfológicos. Sin embargo, este sistema de clasificación puede plantear problemas, ya que no es raro ver más de una categoría en un mismo cultivo (Goodfellow *et al.*, 2012). Afortunadamente, la microscopia electrónica de barrido ha permitido dilucidar muchas dudas y establecer un sistema de reconocimiento mucho más preciso (Kumar *et al.*, 2011).

2.4.3. Ecología

Streptomyces sp. puede ser aislado de grandes cantidades de suelo, el cual es su hábitat natural primario. En la mayoría de suelos, constituye aproximadamente el 1-20% del recuento total viable, es decir, 10^6 UFC/g de suelo (Franco-Correa, 2009). La mayoría de las especies pueden degradar complejos materiales animales y vegetales recalcitrantes, a menudo residuos poliméricos incluyendo polisacáridos (tales como la celulosa, quitina, pectina y almidón), proteínas (por ejemplo, elastina y queratina), compuestos aromáticos y lignocelulosa (Katsifas *et al.*, 2000).

En el suelo, *Streptomyces* sp. puede mostrar pronunciado crecimiento micelial. En este hábitat, ellos se adaptan rápidamente a varios cambios de las condiciones físicas (por ejemplo, cambios en la aireación, sequía, heladas, condiciones de presión hidrostática y anaeróbica y el pH) por la formación de esporas que es una etapa semidormante en el ciclo de vida, y pueden sobrevivir en el suelo durante largos periodos. *Streptomyces* sp. está casi siempre presente como esporas inactivas en el suelo. Una desventaja de la persistencia como espora es la eficiencia de germinación muy baja, que puede ser causada por competencia con otros microorganismos (Flårdh y Buttner, 2009).

2.4.4. Temperatura y pH

Los requisitos del entorno y tolerancia de las especies de *Streptomyces* han sido descritos en detalle a través de los años. La mayoría de especies crecen a temperaturas entre 10 y 37 °C, y por lo tanto, se consideran como mesófilos. Sin embargo, varias especies pueden crecer a temperaturas por encima de 37°C, aunque la mayoría de ellas tienen una respuesta más termotolerante que termófila. Se han estudiado la tolerancia a diversas temperaturas tales como 10, 37 y 45 °C, encontrándose que, aunque en menor proporción, pudieron crecer lentamente a 4 °C. Sin embargo, en muchos casos, la temperatura óptima para el crecimiento rápido o máximo rendimiento puede no ser la mejor elección para el estudio de la producción de metabolitos secundarios (por ejemplo: antibióticos y pigmentos). Esto significa que las condiciones de cultivo están influenciadas por los objetivos del estudio (Agarwal y Mathur, 2016).

La mayoría de las cepas de *Streptomyces* se comportan como neutrófilos en cultivo, creciendo entre pH 5,0 y 9,0, con un óptimo cerca de pH 7,0. Solo unas pocas de las cepas estudiadas por diversos autores han sido capaces de crecer a pH 4,3; aunque grandes poblaciones de cepas acidófilas se han registrado en suelos ácidos. Las cepas acidófilas crecen aproximadamente desde pH 3,3 a 6,5 y de manera óptima entre pH 4,5 hasta 5,5. Sin embargo, existe un amplio espectro de requerimientos de pH entre *Streptomyces* de ambientes ácidos (Zakalyukina *et al.*, 2002). En el otro extremo, las poblaciones de *Streptomyces* alcalófilos poseen un crecimiento óptimo entre 9,0 a 9,5; habiéndose encontrado aislados capaces de crecer a pH 11,5 (Selyanin *et al.*, 2005).

2.4.5. Aislamiento y cultivo

Los miembros del género *Streptomyces* se pueden aislar utilizando los siguientes criterios: 1) La elección del material que contiene a los microorganismos, 2) El

tratamiento previo de la muestra, y en algunos casos, el enriquecimiento de los grupos microbianos elegidos, 3) El uso de medios selectivos, condiciones de incubación selectiva o ambas, y 4) La selección de colonias en función de la morfología definida. *Streptomyces* sp. se puede aislar de una amplia variedad de hábitats (Niebla *et al.*, 2001).

En la mayoría de casos, los organismos se extraen del suelo u otra muestra del medio ambiente, seguida de diluciones seriadas para permitir el cultivo en medios sólidos. Para el aislamiento, la agitación vigorosa de la muestra con el diluyente es necesaria para suspender las esporas o el micelio fragmentado. El tratamiento posterior de las muestras (es decir, la preparación de diluciones y siembra) no difiere mucho de la práctica habitual bacteriológica.

Para reducir o inhibir otros microbios, varios métodos físicos, químicos y biológicos han sido estudiados. La centrifugación de suspensiones de suelo puede separar esporas de *Streptomyces* de otras bacterias y esporas de hongos. El uso de sustancias químicas desinfectantes también ha sido utilizado para reducir la carga microbiana, aprovechando la resistencia de las esporas. Además, se puede obtener una reducción significativa en la proporción de bacterias vegetativas sin afectar el recuento de los actinomicetos por medio de tratamiento térmico del suelo (Goodfellow y Fiedler, 2010).

Para el aislamiento de microorganismos deseados, los medios selectivos son ampliamente utilizados. Mediante la variación de una serie de factores, el medio puede ser favorable para algunos microbios pero no para otros. Los factores que se pueden variar son los siguientes: 1) La composición de nutrientes, especialmente la fuente de carbono y nitrógeno preferido por el microorganismo a aislar, 2) Las sustancias químicas que se pueden añadir al medio para inhibir selectivamente la flora acompañante del hábitat natural o para estimular los organismos deseados, 3) Valores

de pH adecuados para organismos que pueden ser acidófilos, neutrófilos o alcalófilos, 4) Diversas temperaturas a utilizar, dependiendo de la temperatura optima de los microorganismos, por ejemplo termófilos o psicrófilos (Niebla *et al.*, 2001). Para el aislamiento de *Streptomyces*, se han formulado muchos medios empíricamente, tales como el Agar Almidón Caseína, Agar Quitina, Agar Glicerol Asparragina, entre otros.

Los compuestos con actividad antifúngica (antifúngicos) son generalmente utilizados para complementar los medios de aislamiento para reprimir el crecimiento de hongos, tales como la cicloheximida y la nistatina. Los compuestos con actividad antibacteriana necesitan ser utilizados con cuidado, puesto que algunos actinomicetos también pueden ser sensibles a ellos. Tal es el caso de la Polimixina y la Penicilina, que no solo suprimen el crecimiento de otras bacterias, sino también de algunas especies de *Streptomyces*. Pese a ello, no se descarta el uso de antibacterianos para el aislamiento de *Streptomyces*, puesto que medios como el Agar Almidón Caseína funcionan perfectamente cuando se suplementan con antibióticos (Goodfellow *et al.*, 2012).

Las cepas de *Streptomyces* crecen de manera óptima a valores de pH neutros, es decir, son organismos neutrófilos. En consecuencia, la mayoría de los medios de aislamiento tienen valores de pH entre 7 a 7,5. En cuanto a la temperatura de incubación, la mayoría de las especies aisladas son mesófilas. Por lo tanto, las placas de aislamiento por lo general se incuban a 22-37 °C (Agarwal y Mathur, 2016).

2.4.6. Diferenciación de especies dentro del género *Streptomyces*

Los miembros del género *Streptomyces* a menudo se pueden distinguir de otros actinomicetos filamentosos sobre la base de la morfología colonial, en particular por el micelio vegetativo, micelio aéreo, sus esporas y el color del pigmento soluble. Si bien resulta sencillo realizar una caracterización del género, las cosas se complican en la determinación de la especie (Goodfellow *et al.*, 2012).

En el pasado, antes del descubrimiento de la enorme capacidad de *Streptomyces* sp. en la producción de metabolitos secundarios, los pocos estudios sobre el género se llevaron a cabo por los microbiólogos del suelo que estaban principalmente interesados en las cuestiones ecológicas; por lo tanto, solo unas pocas especies se describieron en esos años. Las descripciones eran basadas principalmente en criterios morfológicos, pigmentación y requerimientos ecológicos.

Sin embargo, el descubrimiento de la actinomicina de *Streptomyces antibioticus* promovió un amplio interés en este género como fuente de nuevos compuestos bioactivos. El enfoque en la detección de compuestos bioactivos novedosos de *Streptomyces* conllevó a la asignación de nuevas especies sobre la base de su capacidad de producir nuevos productos naturales. Esta tendencia llevó a una explosión de la descripción de especies, y resultó en una clasificación excesiva de casi 3000 especies (Sharma, 2014).

El *International Streptomyces Project* (ISP) presentó en 1964 criterios estándar para la determinación de las especies. Estas descripciones se basan principalmente en la morfología (es decir, disposición de cadena de esporas, ornamentación superficial de las esporas, color de las esporas, micelio del sustrato, pigmentos solubles y la producción de pigmentos de melanina), y algunas propiedades fisiológicas, que se limitan principalmente a pruebas de utilización de fuentes de carbono. Como resultado, más de 450 especies de *Streptomyces* fueron redescritas, y sus cepas tipo fueron colocadas en colecciones de cultivos reconocidas internacionalmente. Sin embargo, estos estudios no conducen directamente a la generación de esquemas para la identificación de especies de *Streptomyces* (Taddei *et al.*, 2006).

A lo largo de los años se ha tratado de establecer consensos de clasificación de las cepas de este género. Los últimos estudios incluyen, además de la taxonomía, los métodos moleculares aplicándolos en paralelo con la aplicación de procedimientos

numéricos taxonómicos. Los métodos fenotípicos adicionales utilizados para estudiar a *Streptomyces* incluyen análisis de la pared celular, perfiles de ácidos grasos, pruebas bioquímicas rápidas, ensayos serológicos, perfiles de proteínas y la comparación de patrones de la proteína ribosomal (Sharma, 2014).

La secuencia del ADNr 16S es un poderoso método para dilucidar las relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, y se ha utilizado para facilitar la identificación de especies de *Streptomyces*. Sin embargo, las secuencias de este gen en ciertos casos puede ser insuficiente para definir las relaciones filogenéticas entre especies estrechamente relacionadas debido a la conservación evolutiva del ADNr 16S. En contraste con el gen mencionado, las secuencias de genes de la subunidad β del ARN polimerasa (rpoB) son más variables y han demostrado que son mucho más útiles en inferir las relaciones filogenéticas entre microorganismos estrechamente relacionados (Kim *et al.*, 2004).

2.5. Compuestos bioactivos producidos por *Streptomyces* sp.

2.5.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos microbianos secundarios representan una importante fuente de compuestos con estructuras químicas notables y potente actividad biológica (Arasu *et al.*, 2008). Las bacterias pertenecientes al grupo de los actinomicetos expresan importantes atributos fisiológicos y metabólicos, como la producción de enzimas extracelulares y una gran variedad de metabolitos secundarios. La capacidad aparentemente ilimitada de los actinomicetos para producir compuestos bioactivos los hacen especialmente útiles en el desarrollo de nuevos medicamentos. Miles de estos compuestos se han aislado y caracterizado, y varios se utilizan en el tratamiento de enfermedades en los seres humanos, así como en la medicina veterinaria y la agricultura (Spandari *et al.*, 2013).

2.5.2. Enzimas extracelulares

Los actinomicetos representan uno de los grupos de microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en los ecosistemas naturales, los cuales juegan un papel importante en la degradación de materia orgánica. No es sorprendente, por lo tanto, que el genoma de *Streptomyces* codifique un alto número de proteínas que son secretadas al medio externo (Ghanem *et al.*, 2000).

Los actinomicetos pueden secretar amilasas al exterior celular para llevar a cabo la digestión extracelular. Las enzimas amilolíticas son de gran importancia biotecnológica por su aplicación y uso en la industria alimentaria, industria del papel y textil. Otro de los metabolitos conocidos producidos por los actinomicetos son las celulasas, las cuales son un conjunto de enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces glucosídicos de la celulosa y productos relacionados. Son pocos los microorganismos que pueden producir estas enzimas, por lo cual son bastantes requeridas por muchas industrias tales como las productoras de combustibles y la alimentaria. Un tercer grupo de enzimas de importancia son las lipasas, las cuales tienen aplicaciones en diversos sectores como son las industrias de detergentes, productos alimenticios e inclusive las industrias farmacéuticas. Proteasas, xilanasas, quitinasas, ureasas, entre otras, han sido estudiadas en el transcurso de los años, demostrando la enorme capacidad enzimática de los actinomicetos (Sharma, 2014). Por ejemplo, de las aproximadamente 800 proteínas codificadas por *Streptomyces coelicolor*, se han encontrado 147 hidrolasas, de las cuales siete son celulasas y cinco son quitinasas (Goodfellow *et al.*, 2012).

2.5.3. Metabolitos con capacidad antagónica

Uno de los grupos de compuestos bioactivos más importantes estudiados de los microorganismos son aquellas sustancias con capacidad antagónica, como los antibióticos. Dos tercios de los antibióticos que disponen hoy en día son de origen

natural, incluyendo muchos de los que son importantes en la medicina, como los aminoglucosidos, antraciclinas, cloramfenicol, macrólidos, betalactámicos y tetraciclinas (Deepa *et al.*, 2011). La mayoría se obtienen a partir de actinomicetos de origen marino y terrestre, siendo los de origen marino más eficientes en la lucha antimicrobiana debido a que las bacterias terrestres no tienen desarrollado ninguna resistencia contra ellos (Vimal *et al.*, 2009). Entre los 140 géneros de actinomicetos descritos, solo unos pocos son responsables de los más de 10 000 compuestos bioactivos en uso clínico (Adegboye y Babalola, 2013). Aproximadamente el 75% de estos son producidos por cepas del género *Streptomyces* (Muharram *et al.*, 2013).

Los antibióticos obtenidos de estos microorganismos son esencialmente útiles clínicamente para combatir diversos patógenos resistentes a los fármacos, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina y *Enterococcus* sp. resistentes a la Vancomicina. La necesidad de agentes antimicrobianos nuevos, seguros y efectivos son el mayor desafío de la industria farmacéutica en la actualidad, especialmente con el aumento de las infecciones oportunistas en hospederos inmunocomprometidos y cepas multidrogorresistentes (Singh *et al.*, 2012).

Además de los antibióticos empleados para tratar numerosas infecciones, la capacidad de producir compuestos antagonistas para su aplicación en agricultura es otro de los temas que se viene estudiando con gran interés. La razón de ello es la necesidad de contar con nuevas estrategias para enfrentar enfermedades vegetales causadas por agentes fitopatógenos como bacterias y hongos. Los microorganismo con buena actividad antagonista son seleccionados para la elaboración de fórmulas que puedan aplicarse directamente en los suelos. Dos de los aspectos a considerar en el proceso de selección son, primero, la capacidad de multiplicarse sin problema en el ambiente, y segundo, ser lo suficientemente selectivo para afectar únicamente a los fitopatógenos, pero no a las poblaciones autóctonas de la zona. Diversos ensayos de

esta naturaleza han sido probados con éxito con resultados prometedores (Quiñones *et al.*, 2016).

2.6. La papa (*Solanum tuberosum*)

La papa es una planta originaria de los Andes. Los procesos de domesticación y procesamiento artesanal de este cultivo fueron realizados por las culturas prehispánicas, constituyendo la base de su dieta alimentaria. Además, jugó un papel significativo en la tradición y costumbres de los antiguos pobladores del Perú (Rico, 2009).

Es una planta dicotiledónea herbácea anual, la cual presenta un sistema aéreo constituido por el tallo, hojas, flores y frutos; y un sistema subterráneo, formado por la raíz, estolones y tubérculos (Malagamba, 1997). La parte comestible, el tubérculo, es un tallo subterráneo modificado, acortado, engrosado y carnoso, provisto de yemas latentes. Varía mucho en forma, tamaño y color de la piel (Ministerio de agricultura, 2011).

El cultivo de la papa es esencialmente de clima cálido, para cuya producción la temperatura representa la principal limitante. Temperaturas menores a 10 °C o superiores a 30 °C inhiben el desarrollo de los tubérculos, mientras que la mejor producción se observa a una temperatura promedio de 18 a 20 °C. En cuanto al suelo a utilizar para su cultivo, a pesar de que la papa puede crecer en muchos tipos de suelo, el ideal sería un suelo franco arcilloso, con alto contenido de materia orgánica y con un pH entre 5,2 a 7,5 (Ministerio de Agricultura y Riego, 2014). Requiere de humedad abundante y regular, pues es sensible a la sequía. Su mayor tasa productiva se da en la región andina, a altitudes en el rango de 2 000 a 4 000 m.s.n.m, que es un ambiente de bajas temperaturas, días cortos y abundante luz solar (Arce, 2002).

La producción de papa a nivel mundial se está desarrollando a pasos agigantados, esto favorecido principalmente por el mayor aporte de nutrientes a la dieta que otros

cultivos tradicionales como el arroz, trigo y maíz, así como también de las nuevas tecnologías que se vienen desarrollando. Seis países producen cerca del 60% de la producción mundial de papa, siendo China quien encabeza la lista. El Perú, principal centro de origen de la papa, ocupa la posición 19 de productores de papa a nivel mundial, aunque es el que posee la mayor diversidad de variedades, siendo estas alrededor de 3 000. Aquí se cultiva en 19 de las 25 regiones del país (Ministerio de Agricultura, 2011).

2.7. Problemas por los que atraviesa el cultivo de papa

Puno, Huánuco, La Libertad, Junín, Cajamarca, Ayacucho y Ancash son las regiones con mayor producción de papa en el Perú. A pesar de ello, en las zonas de cultivo de estas regiones todavía se siguen empleando prácticas rudimentarias en el proceso de obtención de dicho tubérculo, muchas de ellas debido a la carencia de recursos por parte de los pobladores que se dedican a esta labor (Ministerio de Agricultura, 2011). Los principales problemas que se observan en el campo son la mala calidad de la semilla utilizada, la inadecuada fertilización, la insuficiencia de riego adecuado y el poco control sobre las plagas que puedan afectar los cultivos. Estos problemas, adicionados a los problemas ambientales como son las heladas y sequías disminuyen notoriamente el rendimiento de cultivo de papa así como su calidad y apariencia comercial. Fuera del campo, el almacenamiento de los tubérculos antes de su comercialización también es causa de pérdidas económicas, valor incrementado cuando no se reducen las causas de deterioro en las fases previas a este proceso (UNALM, 2011).

El Perú es el centro de origen de la papa, y es por ello que también es el centro de la presencia de numerosas enfermedades y plagas, los cuales constituyen uno de los problemas más difíciles de combatir. La presencia e intensidad de las mismas varían de una zona ecológica a otra, por lo que las estrategias y métodos de control a aplicar

también son diferentes (Ministerio de Agricultura y Riego, 2013). Aprovechando los conocimientos ancestrales pasados a través de generaciones, los pobladores altoandinos utilizan plantas de la flora andina que se comportan como controladoras biológicas frente al ataque de muchos insectos y hongos, pero, su aplicación es del modo preventiva, es decir, antes de la aparición de una enfermedad o plaga. Además, no se conoce las concentraciones y épocas de aplicación de las mismas (Tapia y Fries, 2007).

Para el control preventivo, se suelen usar agroquímicos de baja toxicidad, pero cuando el daño producido por el ataque de alguna plaga o enfermedad es alta, se requiere la utilización de agroquímicos de alta toxicidad, los cuales ponen en riesgo la salud del trabajador, su familia, el propio cultivo y el medio ambiente (Ramírez *et al.*, 2014). Lamentablemente, los agricultores no tienen la información técnica sobre los niveles de toxicidad de los componentes que utilizan, la dosis de aplicación, los cuidados que deben tener al momento de la aplicación en campo, entre otros (Ministerio de Agricultura y Riego, 2013). Debido a la carencia de dichos datos, durante décadas se han utilizado a los agroquímicos indiscriminadamente, los cuales han conllevado a la aparición de resistencia en los agentes causantes de las enfermedades, especialmente en los microorganismos (Juárez *et al.*, 2010).

2.8. Hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de papa

Hay una enorme pérdida agrícola por patógenos de plantas: 25% en Europa, 42% en África y 43% en Asia (Choi *et al.*, 2009). Del gran número de microorganismos fitopatógenos que afectan a los cultivos de plantas, de una larga lista entre virus, hongos, bacterias, nemátodos y viroides, los hongos constituyen el grupo que causa mayores daños, y por ende, sobre el que más se viene estudiando hoy en día. A nivel mundial, los hongos fitopatógenos originan pérdidas que alcanzan los miles de millones de dólares al año (Cristóbal *et al.*, 2013). Se conoce que alrededor de 8000

especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas (Camargo *et al.*, 2000). Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo, y una especie de este fitopatógeno puede infectar a más de una especie de planta (Rodríguez, 2001), los cuales incluyen entre sus agentes causales más importantes a las royas y carbones, agentes de la pudrición negra (Sharma y Parihar, 2010).

Solanum tuberosum es afectado por numerosos hongos fitopatógenos, siendo la causa más importante de enfermedades en la papa, puesto que pueden ocasionar la destrucción total del cultivo. Dentro de los más importantes, tenemos a *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* (Reinoso *et al.*, 2007, Pérez *et al.*, 2015).

2.8.1. Fusariosis o pudrición seca

Enfermedad de la papa causada por hongos pertenecientes al género *Fusarium*, siendo las principales especies que afectan a este tubérculo *F. solani* y *F. roseum*. El hongo se desarrolla bien en medios de cultivo de laboratorio. Macroscópicamente, presenta micelio aéreo algodonoso. El color puede variar desde blanquecino hasta amarillo, rosa o púrpura. Microscópicamente, se caracteriza por poseer hifas finas hialinas, las cuales producen un gran número de micro y macroconidias tabicadas, esta última característica del género debido a su forma fusiforme en forma de hoz (Peters *et al.*, 2008).

El hongo se encuentra en el suelo en forma de espora capaz de persistir por muchos años. Un aspecto importante para que *Fusarium* sp. pueda infectar a un tubérculo es que requiere una puerta de ingreso, es decir, una herida presente en la epidermis o en la corteza del tubérculo. La infección se produce con mayor frecuencia en la cosecha, al momento de separar los tubérculos del tallo aéreo, lo que produce pequeños cortes que a simple vista pueden no ser visibles, pero son suficientes como punto de

entrada de las esporas del hongo. Las condiciones de almacenamiento, en especial la alta humedad, son las que favorecen la germinación de esporas y el desarrollo de la enfermedad (Torres, 2002).

La sintomatología observada en los tubérculos se describe como la pudrición seca en el almacenaje de tubérculos. En un tubérculo afectado, se observa frecuentemente una superficie de contorno irregular, que puede ser circular; mientras que el tejido interno se torna de color oscuro con una consistencia seca. En ocasiones es posible encontrar fructificaciones del hongo de color blanco (Castro y Contreras, 2011).

2.8.2. Rizoctoniasis o costra negra

Se denomina así a la enfermedad producida por *Rhizoctonia solani*, denominación que recibe la fase asexual del Basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris*. El hongo en medios de cultivo convencionales se caracteriza por presentar un micelio vegetativo incoloro cuando son jóvenes, pero se vuelve de color marrón a medida de que crece y madura. Al microscopio, el micelio se compone de hifas de color marrón oscuro, con numerosas células multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación presenta una constricción. Otra característica resaltante es la presencia de células moniloides, cadenas celulares simples o ramificadas que finalmente forman una masa compacta que da origen a los esclerocios (Woodhall *et al.*, 2008).

La enfermedad se observa con mayor frecuencia en suelos fríos y húmedos, factores relacionados con las condiciones de desarrollo del hongo. El hongo puede permanecer en el ambiente como esclerocios o como micelio en tejidos de descomposición de la superficie de los tubérculos en los residuos de cosecha que se encuentran en el suelo. Las plantas se infectan al momento de la siembra en suelos contaminados con estos residuos procedentes de la cosecha anterior. En presencia de condiciones favorables, los esclerocios germinan y el micelio infecta a los brotes y tallos. A consecuencia del

desarrollo de las plantas, las raíces y estolones terminan de igual forma siendo infectados (Torres, 2002).

En los tubérculos afectados, el síntoma más conocido es la llamada contra negra observada en la superficie de la papa, que vienen a ser las estructuras de resistencia del hongo denominadas esclerocios. Los esclerocios se presentan en diversos tamaños, e incluso puede llegarse a confundir con la tierra procedente del cultivo. El hongo también afecta a los brotes, tallos y estolones, produciendo lesiones características de *Rhizoctonia*, las cuales reciben el nombre de chancros café (Castro y Contreras, 2011).

2.8.3. El tizón tardío de la papa

Nombre que recibe la enfermedad más devastadora de los cultivos de papa. Es causada por el Chromista *Phytophthora infestans*, antes clasificado junto con los hongos fitopatógenos. El cultivo *in vitro* se ve influenciado por diversos factores tales como la composición del medio, nutrientes, temperatura y pH. En placa, presenta micelio aéreo blanco marcadamente radiado o estrellado. Microscópicamente, las hifas son cenocíticas, raramente separado por tabiques en cultivos viejos. La forma de reproducción asexual de la especie depende de la formación de esporangióforos, los cuales no se diferencian normalmente de las hifas. Los esporangios característicos de la especie tienen forma de limón (Fry, 2008).

El patógeno, como en el caso de *Rhizoctonia solani*, sobrevive de una cosecha a otra por medio del micelio presente en tubérculos infectados abandonados en campo o formando parte de los residuos. Al darse las condiciones propicias para su desarrollo, se pueden producir esporangios que a través del aire pueden alcanzar nuevos campos de cultivo. En el proceso de almacenaje de tubérculos infectados aparentemente sanos cosechados en días de lluvias, el patógeno comienza su desarrollo y produce esporangios que infectarán a los tejidos de tubérculos sanos. Si el agricultor siembra

tubérculos infectados que aparentan estar sanos, el micelio del hongo se desarrollará paralelamente al crecimiento de la planta invadiendo todo el interior del tallo. Este tipo de desarrollo es el más devastador, puesto que se comienzan a formar focos infecciosos dentro del mismo campo y para otras zonas de cultivo (Torres, 2002).

Los síntomas de una infección por *Phytophthora infestans* se ven a nivel de toda la planta. En las hojas, la enfermedad se denota por la presencia de manchas irregulares oscuras que con el tiempo conllevan a la formación de lesiones necróticas, en cuyo envés es posible observar a un mildiu blanquecino constituido por numerosos esporangios. En el tallo, se observan lesiones oscuras a nivel del tercio medio o superior de la planta. En los tubérculos, se pueden notar depresiones superficiales e irregulares, de consistencia dura y tamaño variable. Si se realiza un raspado en la zona afectada, el tejido que se observa es de color marrón. Si se realiza un corte transversal, se podrá observar una necrosis de forma irregular que avanza de la periferia del tubérculo hacia el centro medular (Castro y Contreras, 2011).

2.8.4. Pudrición negra del tubérculo

Enfermedad que solo se manifiesta de forma evidente en tubérculos almacenados, cuyo agente causal es *Lasiodiplodia theobromae*, cuya característica en Agar Papa Dextrosa es la de formar un micelio algodonoso de color blanquecino que con el tiempo se torna de color gris oscuro, y que al madurar, se pueden notar numerosos picnidios de color oscuro. En cuanto a su observación microscópica, se observan dos tipos de conidias, unas jóvenes que son hialinas, unicelulares, de pared gruesa y base truncada; mientras que las conidias maduras son a menudo bicelulares, de color marrón oscuro y con estrías longitudinales. Los picnidios presentan forma esferoidal y poseen un color negruzco (Picos *et al.*, 2015).

Existe un gran número de especies vegetales que son afectadas por este fitopatógeno, por lo que se sospecha que este hongo está presente en diversos hábitats, tales como

el suelo, en un estado saprófito. En el campo, la enfermedad pasa desapercibida, puesto que no se ha observado algún tipo de lesión en plantas jóvenes o en los tubérculos al momento de la cosecha. Como se describió para *Fusarium* sp, este patógeno tiene como principal vía de entrada cualquier lesión producida en la epidermis al momento de la cosecha. Las condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas conllevan al desarrollo del hongo dentro de los almacenes (Tovar *et al.*, 2013).

Los síntomas observados varían desde unas pequeñas lesiones en forma de puntos oscuros que pueden pasar inadvertidas, hasta lesiones hundidas, semiblandas y de color marrón intensa. Si el tubérculo permanece almacenado durante un tiempo prolongado, se endurece, se momifica y se arruga, tornándose de una coloración negra producto de la formación de picnidios estromáticos (Ames, 1997).

2.9. Uso de microorganismos antagonistas para el control biológico de hongos fitopatógenos de la papa

Aunque generalmente se suprimen a los fitopatógenos utilizando productos de síntesis química, el uso excesivo del control químico ha conducido a la contaminación ambiental. Además, la eficiencia de estos plaguicidas está disminuyendo continuamente debido al desarrollo de patógenos resistentes. Desde hace 30 años, la mejora de los métodos de control alternativo, incluyendo el uso de microorganismos, ha sido emprendida. La mayoría de los controles biológicos se dirigen hacia los agentes patógenos e implican el uso de bacterias antagonistas que producen antibióticos (Intra *et al.*, 2011).

El antagonismo de los actinomicetos contra una amplia variedad de patógenos, y entre ellos a los hongos, ha sido informado en diversos estudios (Choi *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2011; Muharram *et al.*, 2013). Los microorganismos que colonizan las raíces son ideales para utilizarlos como agentes de biocontrol contra enfermedades causadas por

patógenos del suelo. Los actinomicetos, especialmente las cepas de *Streptomyces*, son cualitativamente y cuantitativamente importantes en la rizósfera, donde colonizan activamente los sistemas de raíces de las plantas, en un sistema de beneficio mutuo, en el cual la planta provee a estos microorganismos a través de los exudados de sus raíces un importante número de compuestos orgánicos para su desarrollo; mientras que los microorganismos solubilizan los nutrientes minerales por medio de sus enzimas y además, sintetizan un conjunto de sustancias antagónicas que inhiben el desarrollo de patógenos de la planta (Gonzales-Franco y Hernández, 2009). Alrededor de 60% de compuestos biológicamente activos desarrollados para el uso agrícola se obtiene a partir de cepas de *Streptomyces* (Intra *et al.*, 2011).

Se han realizado diversos estudios con respecto a la búsqueda de actinomicetos antagonistas frente a hongos fitopatógenos. Castillo (2004) evaluó la efectividad de 90 actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani*, encontrando 24 cepas con buena actividad antifúngica, y alcanzando porcentajes de inhibición de hasta 87,05%. Dávila *et al.* (2008) aislaron un total de 70 actinomicetos cuyo origen es suelo de plantas y hormigueros, quienes demostraron altos niveles de inhibición frente a *Alternaria* sp. (57,6%), *Rhizoctonia* sp. (53,08%), *Fusarium* sp. (49,36%) y *Colletotrichum* sp. (61,57%).

Aprovechando la actividad quitinolítica de 13 cepas de actinomicetos, Farfán y Gutiérrez (2009) evaluaron la capacidad antagónica de sus aislados frente a *Rhizoctonia* sp., con porcentajes de inhibición de hasta 84,44%, y frente a *Fusarium* sp., alcanzado un valor máximo de inhibición de 96,67%. Por su parte, Fonseca *et al.* (2011) evaluaron 25 actinomicetos frente a *Phytophthora infestans*, resultando que 8 de ellas presentaron efecto in vitro con valores de inhibición reportados hasta 77,8%. Sajitha y Florence (2013) aislaron 53 actinomicetos procedentes del compost, madera y suelo, demostrando que 11 de sus aislados poseían capacidad antagonista frente a *Lasiodiplodia theobromae*.

En el Perú, el campo de investigación de actinomicetos con potencial uso como controladores de fitopatógenos de la papa aún es muy escaso, encontrándose pocos estudios registrados en la literatura enfocados en el antagonismo frente a hongos fitopatógenos. Uno de los primeros aportes lo proporciona Rico (2009), quien consiguió aislar 45 cepas de actinomicetos de la rizósfera de la papa con el fin de evaluar su capacidad promotora de crecimiento vegetal, de las cuales, 25 presentaron resultados positivos de antagonismo a *Fusarium solani* con porcentajes de inhibición de hasta 45%; 19 aislados presentaron antagonismo frente al hongo *Rhizoctonia solani*, cuyo máximo porcentaje de inhibición fue de 72,6%; y 17 de dichos actinomicetos tuvieron actividad contra ambos hongos evaluados. Sus estudios se llevaron a la etapa de experimentación a nivel de invernadero, aunque solo se enfocó en la promoción de los actinomicetos del crecimiento de las plantas.

Otro de los aportes importantes lo brinda Pérez *et al.* (2015), quien enfoca sus esfuerzos en la búsqueda de actinomicetos con capacidad antagónica frente a fitopatógenos de la papa. El estudio consigue un total de 85 cepas de actinomicetos aisladas de compost, de las cuales, 22 presentaron actividad contra *Fusarium* sp., con halos de inhibición de hasta 18 mm; 52 cepas mostraron antagonismo frente a *Rhizoctonia solani*, alcanzando halos de inhibición de 27 mm; y 36 de los aislados demostraron su capacidad antagónica contra *Phytophthora infestans*, con un valor máximo de halo de inhibición de 22 mm. Un aspecto a resaltar en este trabajo es la obtención de los compuestos activos mediante la técnica de extracción por solvente, utilizando diclorometano y etil acetato para la obtención de los extractos orgánicos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Los actinomicetos nativos presentes en la rizósfera de la papa (*Solanum tuberosum*) son productores de compuestos bioactivos con capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos de importancia en el cultivo de este tubérculo.

- **Variables Independientes:** Actinomicetos, hongos fitopatógenos, medios de cultivo.
- **Variables dependientes:** Compuestos bioactivos, actividad antagónica de actinomicetos frente a hongos fitopatógenos.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Determinar la capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* frente a hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de papa.

3.2.2. Objetivos específicos

1. Aislar cepas de actinomicetos nativos presentes en la rizósfera de la papa (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) cultivadas en la localidad de Andahuaylas-Perú
2. Caracterizar fenotípicamente los actinomicetos aislados.
3. Evaluar la capacidad antagonista de los actinomicetos aislados frente a hongos patógenos que afectan a los cultivos de papa.
4. Realizar la caracterización microscópica de los actinomicetos con potencial aplicación como biocontroladores de hongos patógenos que afectan a los cultivos de papa.

5. Realizar el análisis de las secuencias del ADNr 16S de los actinomicetos con potencial aplicación como biocontroladores de hongos patógenos que afectan a los cultivos de papa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Colecta del material vegetal de estudio

Las muestras de rizósfera de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* “papa” fueron recolectadas en el mes de enero (primer muestreo) y abril del 2014 (segundo muestreo) de campos de cultivo ubicados en la localidad de Andahuaylas, Región Apurímac, Perú.

4.1.2. Cepas de hongos fitopatógenos

Se utilizaron cepas referenciales de hongos fitopatógenos, como testigos de las pruebas de antagonismo, provenientes del Centro Internacional de la Papa (CIP): *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Phytophthora infestans*.

4.2. Métodos

4.2.1. Toma de muestras y transporte al laboratorio de trabajo

El muestreo se realizó en tres campos de cultivo de papa ubicados en la región de Apurímac, localidad de Andahuaylas, Perú. De cada campo de cultivo, se tomaron muestras de rizósfera de 2 plantas al azar (raíces y el suelo que rodea a cada planta), realizando una mezcla de las mismas. De aquella mezcla, se colectó aproximadamente 1 kg de muestra, las cuales se colocaron en bolsas Ziploc rotuladas y posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM para su procesamiento (Calvo *et al.*, 2008).

4.2.2. Aislamiento de actinomicetos de suelo

Se pesó 10 g de suelo de cada muestra seca compuesta por la rizósfera de los cultivos, los cuales se colocaron dentro de una envase estéril con 90 mL de solución salina con 1,5% de fenol, la cual se agitó vigorosamente alrededor de 25 veces y

dejando en incubación por 30 minutos a 30 °C. Esta primera dilución fue considerada como 10^{-1} , de la cual se tomó 1 mL y se transfirió a 9 mL de solución salina, de esta manera realizando diluciones seriadas hasta llegar a 10^{-4} (Hayakawa *et al.*, 2004). Luego, 100 µL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se sembraron por duplicado en Agar Almidón Caseína suplementado con Nistatina a una concentración de 50 µg/mL para inhibir la flora micótica acompañante y Ácido nalidíxico a una concentración de 25 µg/mL para inhibir la flora Gram negativa. Las placas fueron incubadas a 28 °C por 15 a 20 días (León *et al.*, 2007).

4.2.3. Selección de colonias de actinomicetos

Aquellas placas que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de actinomicetos fueron escogidas para la purificación de las cepas (Anexo 1). De cada una de las placas se seleccionaron colonias de morfologías diferentes típicas de actinomicetos, las cuales son colonias secas, fuertemente adheridas al agar y que tienen apariencia aterciopelada, granulosa o pulverulenta. Estas fueron sembradas por estriado en Agar Almidón Caseína suplementado con Nistatina y Ácido Nalidíxico, y se incubaron a las condiciones anteriormente mencionadas. Todos los cultivos contaminados fueron replicados hasta la obtención de cultivos puros (Rico, 2009).

4.2.4. Caracterización fenotípica de los aislamientos

Se realizaron en su mayoría identificación morfológica, así como la producción de pigmentos difusibles y la utilización de ciertos carbohidratos como fuente de carbono.

4.2.4.1. Caracterización morfológica

Los cultivos puros se describieron teniendo en cuenta características macroscópicas de la colonia como superficie, forma, tamaño, así como la producción de pigmentos. Para la identificación microscópica de género se realizaron microcultivos, utilizando como colorante de contraste al azul de lactofenol (Franco-Correa *et al.*, 2010),

teniendo en cuenta características como micelio aéreo y vegetativo, fragmentación del micelio, agrupación de esporas, entre otras, comparándolas con las descritas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Goodfellow *et al.*, 2012).

4.2.4.2. Caracterización bioquímica

Para la caracterización bioquímica del metabolismo de los actinomicetos, se realizaron pruebas de asimilación y utilización de carbohidratos, tales como glucosa, manitol y sacarosa (Rico, 2009), los cuales se adicionaron en una concentración al 1% a tubos con caldo nutritivo, utilizando como indicador de pH al púrpura de bromocresol. Puesto que a pH neutro el indicador es netamente púrpura, aquellos actinomicetos que producto de su metabolismo utilicen a los carbohidratos por medio de la vía fermentativa con producción de ácidos orgánicos descenderán el pH del medio, con lo cual el indicador comenzará a tornarse a un rojo intenso, y que con el tiempo si la utilización del carbohidrato es elevada, llevará al indicador a una tonalidad amarilla, lo cual ocurre cuando el pH se encuentra por debajo de 5,2. En el caso contrario, si no hubiese utilización de carbohidratos, el microorganismo utilizará la peptona del medio, con lo cual el indicador permanece en su tonalidad inicial lo cual denota a su vez, un resultado negativo para la utilización de azúcares (Anexo 2).

También se usaron los medios recomendados por el *International Streptomyces Project* (ISP) para una caracterización más completa de los actinomicetos a nivel de género (Shirling y Gottlieb, 1966). Además, se determinó la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas para la utilización de polisacáridos tales como almidón y celulosa. Se prepararon medios de cultivo tales como Agar Almidón y Agar Mandels y Reese, a los cuales se les colocó una concentración de 1% (p/v) de los carbohidratos almidón y carboximetilcelulosa respectivamente. Sobre la superficie del medio, se sembraron por puntura y por duplicado a los actinomicetos. Las placas se incubaron a 28 °C por 7 días. Posteriormente, para la determinación de la actividad amilolítica, se

cubrió la superficie del medio con Lugol para observar la formación de un halo que confirme la producción de esta enzima hidrolítica. En el caso de la actividad celulolítica, a la superficie del medio se añadió solución de Rojo de Congo para observar los halos producto de actividad de la enzima hidrolítica (Anexo 3).

4.2.5. Caracterización fisiológica de actinomicetos

Los actinomicetos fueron caracterizados en función de pruebas fisiológicas según lo señalado por Calvo y Zúñiga (2010) modificado (Anexo 4).

4.2.5.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura

En placas de Agar Almidón Caseína se sembraron por duplicado 5 μ L (10^8 UFC/mL) de un cultivo de 5 días de actinomicetos en medio Extracto de Levadura Glucosa, las cuales se incubaron a las temperaturas de 4 y 20 °C, usando un control a 28 °C. La evaluación se realizó midiendo el diámetro de las colonias cada 48 horas durante 15 días, con el fin de comprobar el crecimiento y adaptabilidad de cada aislamiento a las diferentes temperaturas a las que se enfrenta el cultivo de papa en el Perú.

4.2.5.2. Rango de crecimiento en función del pH

En placas con Agar Almidón Caseína regulado a diferentes gradientes de pH se sembró por duplicado 5 μ L (10^8 UFC/mL) de un cultivo de 5 días de actinomicetos en Medio Extracto de Levadura Glucosa. Los medios fueron regulados a pH 5,5, 7 y 8,5, utilizando el segundo valor de pH como control. El crecimiento se evaluó cada 48 horas por 8 días midiendo el diámetro de las colonias con el fin de determinar su capacidad adaptativa a suelos de pH altos y bajos que presentan algunas zonas de la serranía del Perú.

4.2.6. Conservación de los cultivos puros de actinomicetos

La conservación a largo plazo de los actinomicetos aislados hasta la realización de la prueba de antagonismo se realizó sembrándolos en viales con 4 mL de Agar Almidón

Caseína con glicerol. Estos fueron almacenados en un congelador a 4 °C (Sánchez *et al.*, 2011)

4.2.7. Reactivación de hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos seleccionados por su importancia agrícola en los cultivos de papa para los ensayos de antagonismo fueron *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Lasiodiplodia* sp. y *Phytophthora infestans*. Estos hongos fueron resembrados en Agar Papa Dextrosa para su reactivación y mantenimiento, con excepción de *Phytophthora infestans*, el cual se reactivó en Agar Centeno.

4.2.8. Prueba de antagonismo en placa

Para el ensayo de antagonismo en placa, las cepas de actinomicetos se sembraron en 3 extremos equidistantes de una placa Petri con Agar Almidón Caseína, incubándolos a 25°C por 5 días. Transcurrido el tiempo pactado, en el centro de la placa donde se sembraron a los actinomicetos, se sembró por puntura al hongo fitopatógeno, cuyas esporas procedieron de la región de crecimiento activo de un cultivo madre de cada hongo fitopatógeno a evaluar. Además, se realizó una siembra por puntura de cada hongo fitopatógeno en el centro de una placa con Agar Almidón Caseína sin actinomicetos, las cuales sirvieron como control. Todas las placas se sembraron por duplicado y se incubaron a 25 °C hasta por 7 días (Castillo, 2004). Finalmente, se tomaron las medidas de las áreas alrededor de cada cepa de actinomiceto para calcular el porcentaje de inhibición (Anexo 5), resultado que se expresó siguiendo la técnica propuesta por Ahmed *et al.* (2007).

4.2.9. Obtención del extracto orgánico

La obtención del extracto orgánico se realizó de acuerdo al procedimiento realizado por Pérez *et al.* (2015). Una suspensión de los actinomicetos de los cuales se comprobó la actividad antagónica se inoculó en un Matraz Erlenmeyer de 500 mL con

150 mL de Medio Extracto de Levadura Glucosa. El matraz se incubó por 10 días a temperatura ambiente sobre un agitador a 250 rpm. Transcurrido ese tiempo, el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 25 minutos, y el sobrenadante fue sometido al método de extracción por solvente para recuperar y concentrar los metabolitos antimicrobianos presentes en el cultivo. Los solventes utilizados fueron etil acetato, diclorometano, hexano y butanol, los cuales se agregaron al sobrenadante en una proporción de 1:1 (v/v), agitando la mezcla vigorosamente por 1 hora para completar la extracción.

Después que los extractos orgánicos fueron separados de la fase acuosa, estos fueron llevados para evaporación con ayuda de un rotavapor a 40 °C; luego el residuo obtenido fue pesado y re-suspendido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% para su conservación y posterior análisis (Anexo 6).

4.2.10. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos

Un volumen conocido del extracto orgánico recuperado y re-suspendido en dimetilsulfóxido al 10% se colocó en pocillos de 5 mm practicados sobre el medio Agar Papa Dextrosa, donde fueron previamente sembrados los hongos fitopatógenos. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiental por 5 días. La actividad antifúngica se determinó por la medida del halo de inhibición según Pandey *et al.* (2004).

4.2.11. Análisis estadístico

Los datos concernientes a las pruebas de antagonismo fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) utilizando el software IBM SPSS Statistics 20.0.

4.2.12. Caracterización microscópica de los actinomicetos con mayor actividad antifúngica

Las cepas que presentaron la mejor actividad antimicrobiana fueron observadas detalladamente mediante la Microscopía Electrónica de Barrido, servicio brindado por

el Laboratorio de equipamiento especializado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

4.2.13. Análisis del ADNr 16S de los actinomicetos aislados con mayor actividad antifúngica

Se siguió la metodología propuesta por Cook & Meyers (2003) mediante el uso de secuencias nucleotídicas de un segmento del gen ADNr 16S (Anexo 7).

4.2.13.1. Extracción de ADN

Las cepas de actinomicetos con mejores resultados de actividad antifúngica fueron sembradas en Medio Extracto de Levadura Glucosa en agitación a 250 rpm por 18 a 24 horas. Luego de comprobarse la pureza del cultivo por tinción Gram, el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm durante 25 minutos. El paquete celular obtenido fue lavado con buffer Tris-HCl 10 mM/EDTA (pH 7) y fue re-suspendido en el mismo buffer. Las muestras fueron calentadas en agua hirviendo por 10 minutos, se dejaron enfriar por 5 minutos y se centrifugaron nuevamente a 4000 rpm por 3 minutos. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Winsconsin, E.E.U.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.13.2. Amplificación del ADNr 16S por PCR

Se llevó a cabo utilizando como molde el ADN genómico extraído de los actinomicetos. Los primers utilizados para la reacción de PCR fueron el F1 (5'-AGAGTTTGATCITGGCTCAG-3', I=inosina) y el R5 (5'-ACGGITACCTTGTTACGACTT-3'). El programa que se utilizó en el termociclador marca Multigene Gradient (Labnet International Inc, Nueva York, E.E.U.U.) consta de una denaturación inicial (96 °C por 2 minutos), 30 ciclos de denaturación (96 °C por 45 segundos), hibridación (56 °C por 30 segundos) y extensión (72 °C por 2 minutos), y una extensión final (72 °C por 5 minutos).

4.2.13.3. Confirmación de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para el revelado se realizó un tñido con Bromuro de Etidio a una concentración de 10 µg/ml. Luego de confirmar el producto de PCR, los ADNs amplificados fueron posteriormente enviados a MacroGen Inc. (Seul, Korea) para su secuenciamiento.

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó utilizando la herramienta BLASTN del NCBI (Altschul *et al.*, 1997) y los análisis evolutivos se realizaron con el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Selección de colonias de actinomicetos

Habiéndose cumplido el tiempo de incubación, se revisaron las placas de Almidón Caseína en busca de colonias típicas de actinomicetos: colonias secas, fuertemente adheridas al agar y de apariencia aterciopelada, granulosa o pulverulenta, con o sin producción de pigmento. Estas fueron sembradas por estriado en Agar Almidón Caseína con la finalidad de obtener cultivos puros (Figura 1). En total se obtuvieron 49 aislamientos de actinomicetos.



Figura 1. Cultivos puros de cuatro cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de cultivos de papa

5.2. Caracterización fenotípica de los aislamientos

5.2.1. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de los actinomicetos se realizó en base a las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos. En cuanto a las características macroscópicas, como se puede observar en la Tabla 1, las colonias de actinomicetos presentan en su mayoría una coloración blanca, forma circular,

elevación convexa, borde entero, consistencia dura y producción de pigmentos, especialmente marrón. La caracterización microscópica mediante la técnica de microcultivos, permitió observar detalles del micelio aéreo y vegetativo, la fragmentación del micelio y la agrupación de esporas. En la mayor parte de las láminas de microcultivo de cada muestra, se apreció una disposición de esporas a manera de espiral, típica del género *Streptomyces* (Figura 2).

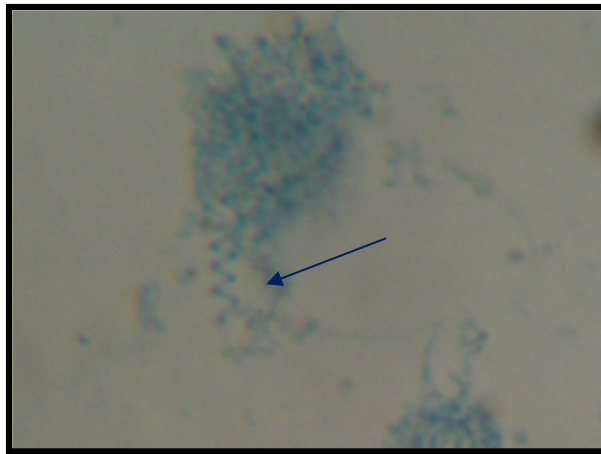


Figura 2. Observación microscópica de un microcultivo de actinomicetos con formación de filamentos en espiral (flecha)

5.2.2. Caracterización bioquímica

La primera parte de la caracterización bioquímica fue en base a la prueba de asimilación y utilización de carbohidratos. Tanto la utilización positiva como negativa de los azúcares se detectaron gracias al viraje del indicador azul de bromotimol, como se observa en la Figura 3.

Tabla 1. Características macroscópicas de las colonias de actinomicetos en Agar

Almidón Caseína incubado a 28°C por 15 días.

Nro de cepa	Código de cepa	Color	Forma	Elevación	Borde	Consistencia	Pigmento
1	AND 1	Beige	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Marrón
2	AND 2	Ámbar	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	sp
3	AND 3	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	Naranja
4	AND 4	Beige	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Marrón
5	AND 5	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
6	AND 6	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
7	AND 7	Marrón	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	Marrón
8	AND 8	Blanco	Irregular	Acuminada	Ondulado	Dura	Naranja
9	AND 9	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	sp
10	AND 10	Purpura	Circular	Convexa	Entero	Dura	Lila
11	AND 11	Marrón	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
12	AND 12	Beige	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
13	AND 13	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Naranja
14	AND 14	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
15	AND 15	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Naranja
16	AND 16	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	sp
17	AND 18	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
18	AND 19	Beige	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Marrón
19	AND 20	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	sp
20	AND 21	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
21	AND 22	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
22	AND 23	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
23	AND 24	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
24	AND 25	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	sp
25	AND 26	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	sp
26	AND 27	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
27	AND 28	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	Beige
28	AND 29	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	Beige
29	AND 30	Marrón	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
30	AND 31	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	Beige
31	AND 32	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	sp
32	AND 33	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
33	APW 1	Marrón	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
34	APW 2	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
35	APW 3	Beige	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
36	APW 4	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Naranja
37	APW 5	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
38	APW 6	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
39	APW 7	Blanco	Irregular	Pulviniforme	Ondulado	Dura	Naranja
40	APW 8	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	sp
41	APW 9	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Naranja
42	APW 10	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	sp
43	APW 11	Blanco	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	sp
44	APW 13	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
45	APW 15	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
46	APW 16	Marrón	Puntiforme	Elevada	Lobulado	Dura	sp
47	APW 17	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	sp
48	APW46b	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Dura	Marrón
49	APW49g	Marrón	Puntiforme	Convexa	Entero	Dura	Marrón

sp: Sin pigmentación

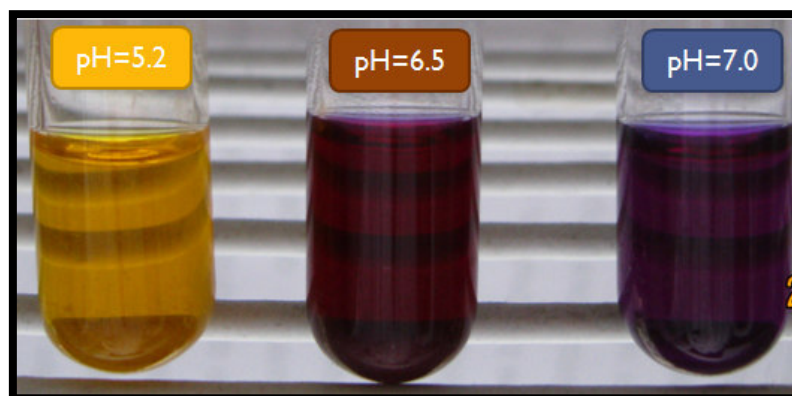


Figura 3. Indicador purpura de bromocresol a diferentes pHs.

Los resultados de utilización de carbohidratos por los actinomicetos fueron muy variables (Tabla 2). Por la cantidad de carbohidratos utilizados (Figura 4), los actinomicetos que no utilizaron ninguno de los carbohidratos ensayados fueron 5 (10,2%), los que solo utilizaron uno de ellos fueron 11 (22,4%), los que utilizaron dos fueron 11 (22,4%), mientras que los que usaron todos fueron 22 (45%). Por el tipo de azúcar asimilado, aquellos actinomicetos que usaron la glucosa fueron 29 cepas (59,2%), los que utilizaron la sacarosa fueron 32 (65,3%), y los que utilizaron el manitol fueron 38 (77,6%).

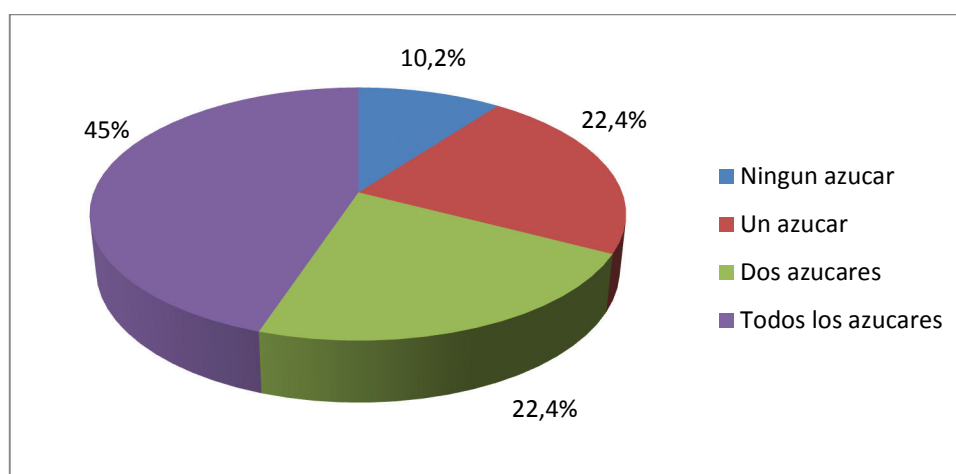


Figura 4. Porcentajes de actinomicetos aislados en relación a la utilización de azúcares utilizados por cada cepa.

Tabla 2. Prueba de asimilación y utilización de carbohidratos por los actinomicetos.

Nro de cepa	Código de cepa	Glucosa	Sacarosa	Manitol
1	AND 1	+	+	+
2	AND 2	+	+	+
3	AND 3	-	+	+
4	AND 4	-	+	+
5	AND 5	+	+	+
6	AND 6	+	+	+
7	AND 7	+	+	+
8	AND 8	-	-	-
9	AND 9	-	+	+
10	AND 10	-	+	-
11	AND 11	-	+	-
12	AND 12	+	+	+
13	AND 13	-	+	+
14	AND 14	+	+	+
15	AND 15	+	+	-
16	AND 16	+	+	-
17	AND 18	+	+	+
18	AND 19	+	-	+
19	AND 20	-	+	+
20	AND 21	+	+	+
21	AND 22	+	+	+
22	AND 23	+	+	+
23	AND 24	+	+	+
24	AND 25	+	+	+
25	AND 26	+	+	+
26	AND 27	+	+	+
27	AND 28	+	+	+
28	AND 29	+	+	+
29	AND 30	+	+	+
30	AND 31	+	+	+
31	AND 32	+	+	+
32	AND 33	+	+	+
33	APW 1	-	-	-
34	APW 2	+	-	-
35	APW 3	+	-	-
36	APW 4	-	-	-
37	APW 5	+	-	+
38	APW 6	+	-	+
39	APW 7	-	-	+
40	APW 8	-	-	+
41	APW 9	-	-	+
42	APW 10	-	-	+
43	APW 11	-	-	+
44	APW 13	-	-	+
45	APW 15	-	+	+
46	APW 16	-	-	+
47	APW 17	+	+	+
48	APW 46b	-	-	-
49	APW 49g	-	-	-

Resultados: Positivo (+), Negativo (-).

La segunda parte se realizó sembrando a los actinomicetos en los medios especificados por el ISP para la determinación de géneros y especies de Actinomicetos. Los aislados sembrados en los medios del 1 al 7 mostraron un patrón de crecimiento y características morfológicas sin mucha variación a comparación de lo observado en las placas de Agar Almidón Caseína. El medio 8 agregó información adicional, puesto que se pudo comprobar que 15 aislados (30,6%) fueron capaces de reducir los nitratos a nitritos, mientras que el medio 9 sirvió para corroborar los resultados obtenidos en la prueba de utilización de azúcares. La tabla 3 nos muestra como ejemplo las características de una de las cepas seleccionadas en los distintos medios del ISP.

Tabla 3. Características de la cepa AND 24 en los diversos medios del *International Streptomyces Project*



Medios del <i>International Streptomyces Project</i>	Características observadas	Imagen
Medio 1: Caldo Triptona-Extracto de levadura	Buen crecimiento en caldo. Colonias a manera de conglomerados blancos y sin pigmentación del medio líquido	
Medio 2: Agar Extracto de levadura-Extracto de malta	Colonias blancas de abundante crecimiento, de forma irregular, consistencia dura y sin presencia de pigmento	

Tabla 3 (continuación). Características de la cepa AND 24 en los diversos medios del
International Streptomyces Project





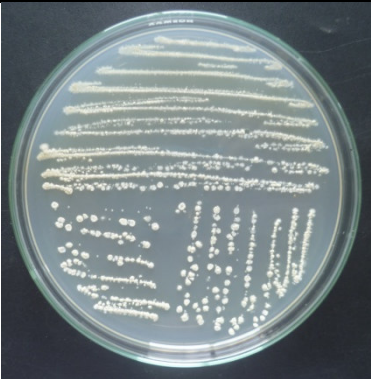


Medio 3: Agar Avena	Micelio aéreo blanco, de forma irregular y de consistencia dura sin presencia de pigmento	
Medio 4: Agar Almidón-Sales inorgánica	Colonias blancas definidas, de forma circular, consistencia dura no pigmentadas	
Medio 5: Agar glicerol-Asparragina	Colonias blancas de forma circular, consistencia dura y sin pigmentación	
Medio 6: Agar Peptona de hierro-Extracto de levadura	Crecimiento abundante con evidencia de pigmento naranja	

Tabla 3 (continuación). Características de la cepa AND 24 en los diversos medios del *International Streptomyces Project*

Medio 7: Agar Tirosina	Colonias blancas definidas de borde circular y sin pigmento	
Medio 8: Caldo Nitrato	Reducción de nitratos a nitritos evidenciado por el cambio de coloración luego de la adición de los reactivos de Griess	
Medio 9: Medio de utilización de carbohidratos	Uso de glucosa, manitol y sacarosa evidenciados por el crecimiento	

La última parte de la caracterización bioquímica está relacionada a la capacidad para sintetizar enzimas capaces de degradar polisacáridos tales como almidón y celulosa (Tabla 4). Dentro de los resultados, encontramos que el 89,8% de las cepas son capaces de sintetizar amilasas, siendo la cepa 34 (APW 2) la que tiene mayor actividad amilolítica (Figura 5); mientras que el 26,5% son capaces de sintetizar celulasas, siendo las cepas 41 y 45 (APW 9 y APW 15, respectivamente) las que tiene mayor actividad celulolítica (Figura 6).

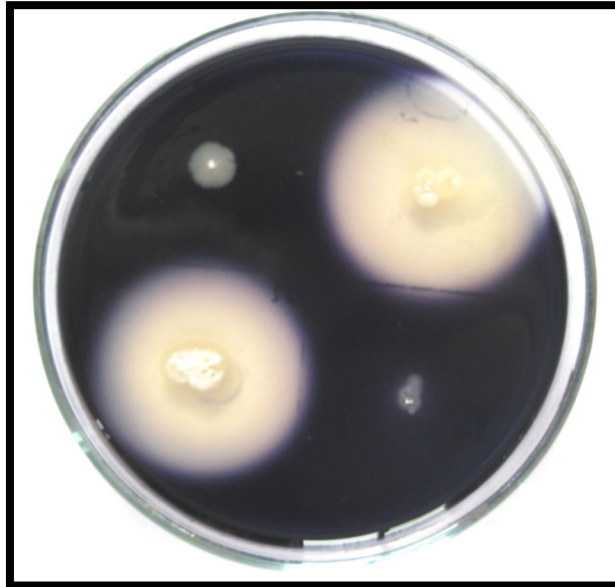


Figura 5. Actividad amilolítica de los actinomicetos en Agar Almidón revelada con lugol

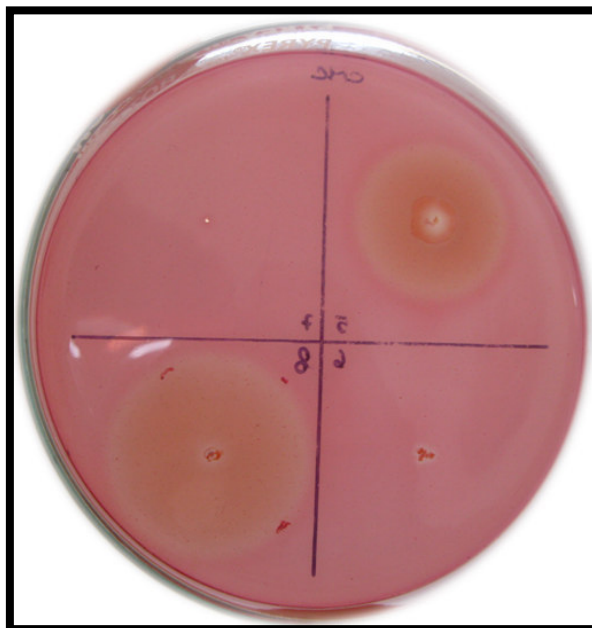


Figura 6. Actividad celulolítica de los actinomicetos en Agar Mandels y Reese
revelada con rojo de congo al 1%

Tabla 4. Producción de enzimas hidrolíticas para el uso de polisacáridos por los actinomicetos.

Nro de cepa	Código de cepa	Porcentaje de actividad enzimática (% $\pm \sigma$)	
		Actividad amilolítica	Actividad celulolítica
1	AND 1	73,7 \pm 0,1	0,0
2	AND 2	50,0 \pm 0,2	71,4 \pm 0,1
3	AND 3	57,1 \pm 0,1	0,0
4	AND 4	37,5 \pm 0,3	0,0
5	AND 5	78,6 \pm 0,2	0,0
6	AND 6	72,2 \pm 0,1	0,0
7	AND 7	64,3 \pm 0,1	77,8 \pm 0,1
8	AND 8	81,0 \pm 0,2	0,0
9	AND 9	62,5 \pm 0,1	0,0
10	AND 10	33,3 \pm 0,3	0,0
11	AND 11	40,0 \pm 0,1	0,0
12	AND 12	69,2 \pm 0,1	0,0
13	AND 13	72,7 \pm 0,2	0,0
14	AND 14	83,3 \pm 0,2	0,0
15	AND 15	78,9 \pm 0,1	0,0
16	AND 16	78,9 \pm 0,1	0,0
17	AND 18	78,9 \pm 0,2	0,0
18	AND 19	78,9 \pm 0,1	0,0
19	AND 20	77,8 \pm 0,1	0,0
20	AND 21	77,8 \pm 0,1	0,0
21	AND 22	50,0 \pm 0,1	0,0
22	AND 23	33,3 \pm 0,2	82,4 \pm 0,2
23	AND 24	81,3 \pm 0,3	0,0
24	AND 25	76,2 \pm 0,3	0,0
25	AND 26	77,8 \pm 0,1	0,0
26	AND 27	66,7 \pm 0,1	0,0
27	AND 28	77,8 \pm 0,1	0,0
28	AND 29	72,2 \pm 0,1	0,0
29	AND 30	0,0	0,0
30	AND 31	80,0 \pm 0,1	0,0
31	AND 32	0,0	0,0
32	AND 33	76,5 \pm 0,1	0,0
33	APW 1	66,7 \pm 0,3	0,0
34	APW 2	84,2 \pm 0,1	0,0
35	APW 3	72,7 \pm 0,2	0,0
36	APW 4	66,7 \pm 0,3	75,0 \pm 0,1
37	APW 5	66,7 \pm 0,1	0,0
38	APW 6	72,7 \pm 0,1	85,7 \pm 0,1
39	APW 7	71,4 \pm 0,2	87,5 \pm 0,1
40	APW 8	66,7 \pm 0,1	87,5 \pm 0,3
41	APW 9	40,0 \pm 0,1	90,0 \pm 0,1
42	APW 10	0,0	0,0
43	APW 11	75,0 \pm 0,1	0,0
44	APW 13	75,0 \pm 0,2	50,0 \pm 0,1
45	APW 15	71,4 \pm 0,1	90,0 \pm 0,2
46	APW 16	71,4 \pm 0,1	85,7 \pm 0,1
47	APW 17	60,0 \pm 0,3	87,5 \pm 0,2
48	APW 46b	0,0	0,0
49	APW 49g	0,0	75,0 \pm 0,1

σ : Desviación estándar

5.3. Caracterización fisiológica de los actinomicetos

5.3.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura

Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro de las colonias en el Agar Almidón Caseína, con la finalidad de hacer una comparación entre el tamaño alcanzado en condiciones normales y en las modificadas, mediante una relación de porcentaje con respecto al control (Tabla 5). Así, se llegó a determinar que a 4 °C, 12 cepas (24,5%) no llegaron a crecer, y de las que sí lo hicieron, 20 de ellas (40,8%) redujeron en más de 50% su crecimiento con respecto al control (Figura 7); mientras que a 20 °C, los 49 aislados (100%) lograron crecer, y solo el 6,1% redujeron en más del 50% su crecimiento con respecto al control (Figura 8).

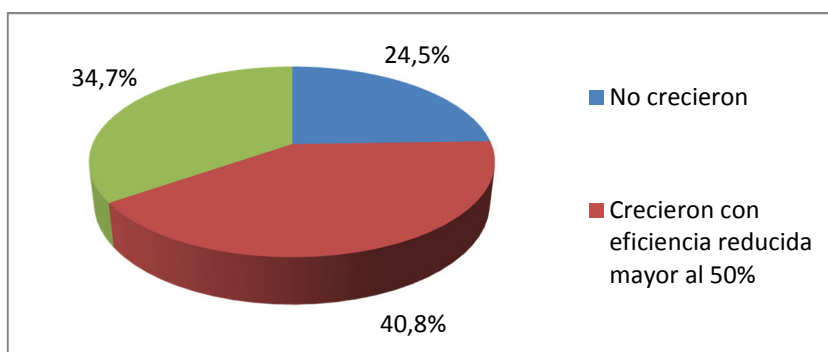


Figura 7. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a 4 °C.

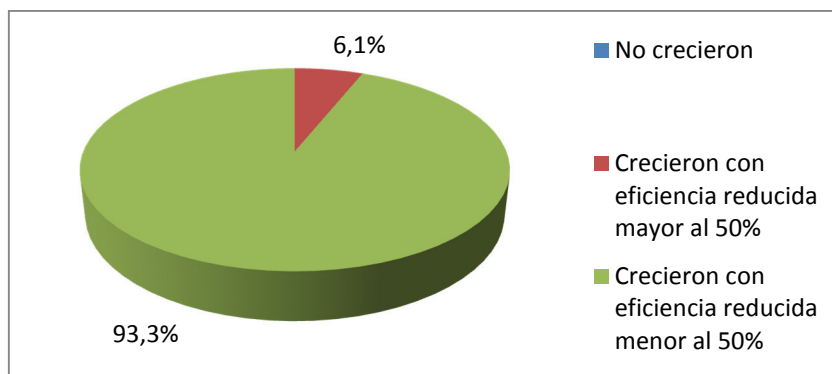


Figura 8. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a 20 °C.

Tabla 5. Porcentaje de eficiencia de crecimiento de actinomicetos a diferentes temperaturas con respecto al control (28 °C) a los 15 días.

Nro de cepa	Código de cepa	Porcentaje de eficiencia de crecimiento en función de la temperatura con respecto al control	
		4 °C	20 °C
1	AND 1	48,0	100,0
2	AND 2	57,1	78,6
3	AND 3	31,8	45,5
4	AND 4	57,9	89,5
5	AND 5	47,4	57,9
6	AND 6	68,8	93,8
7	AND 7	72,7	100,0
8	AND 8	9,1	54,5
9	AND 9	0,0	11,1
10	AND 10	8,3	91,7
11	AND 11	0,0	90,0
12	AND 12	66,7	100,0
13	AND 13	0,0	100,0
14	AND 14	58,8	82,4
15	AND 15	35,3	64,7
16	AND 16	36,8	84,2
17	AND 18	47,8	65,2
18	AND 19	52,4	81,0
19	AND 20	66,7	73,3
20	AND 21	72,7	81,8
21	AND 22	72,7	100,0
22	AND 23	0,0	100,0
23	AND 24	0,0	53,3
24	AND 25	8,3	83,3
25	AND 26	0,0	100,0
26	AND 27	0,0	100,0
27	AND 28	21,4	100,0
28	AND 29	25,0	87,5
29	AND 30	42,1	68,4
30	AND 31	62,5	81,3
31	AND 32	62,5	93,8
32	AND 33	36,8	84,2
33	APW 1	11,1	77,8
34	APW 2	25,0	100,0
35	APW 3	0,0	100,0
36	APW 4	0,0	100,0
37	APW 5	39,1	91,3
38	APW 6	43,5	73,9
39	APW 7	0,0	100,0
40	APW 8	58,8	82,4
41	APW 9	60,0	73,3
42	APW 10	66,7	73,3
43	APW 11	72,7	81,8
44	APW 13	72,7	100,0
45	APW 15	9,1	54,5
46	APW 16	0,0	11,1
47	APW 17	8,3	91,7
48	APW 46b	0,0	90,0
49	APW 49g	39,1	56,5

Un análisis gráfico de un grupo de cepas (del AND 1 al AND 5) reveló el tipo de respuesta fisiológica de los actinomicetos en función de la variación de la temperatura. Como se aprecia en la Figura 9, el crecimiento se ve favorecido a mayor temperatura. Este patrón de comportamiento se observa para todos los actinomicetos del presente estudio.

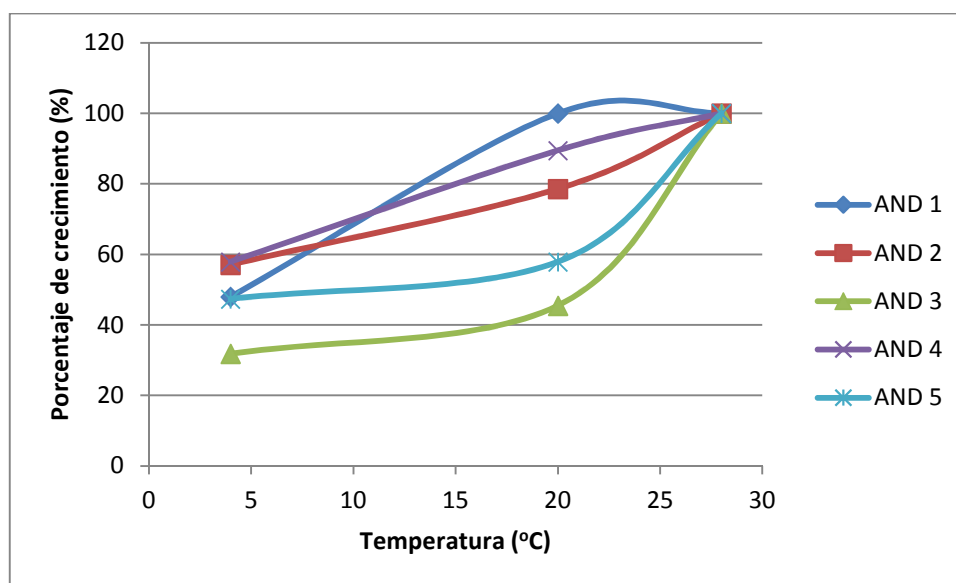


Figura 9. Porcentaje de crecimiento de los actinomicetos en función de la temperatura

5.3.2. Rango de crecimiento en función del pH

Un procedimiento similar al anterior se utilizó para evaluar el rango de crecimiento en función del pH. Transcurrido el tiempo de crecimiento, se realizaron las mediciones y se halló la relación de porcentaje con respecto al control, que presentaba pH 7 (Tabla 6). En este ensayo, se llegó a determinar que a pH 5.5, 17 cepas (34,7%) no llegaron a crecer, y de las que sí lo hicieron, el 42,9% redujeron en más de 50% su eficiencia de crecimiento con respecto al control (Figura 10); mientras que a pH 8,5, el 98% logró crecer, y todas ellas tuvieron una eficiencia de crecimiento mayor al 50% respecto al control (Figura 11).

Tabla 6. Porcentaje de eficiencia de crecimiento de actinomicetos a diferentes pHs con respecto al control (pH 7) a los 15 días.

Nro de cepa	Código de cepa	Porcentaje de eficiencia de crecimiento en función del pH con respecto al control	
		5,5	8,5
1	AND 1	0,0	80,0
2	AND 2	0,0	100,0
3	AND 3	0,0	90,9
4	AND 4	0,0	100,0
5	AND 5	26,3	73,7
6	AND 6	0,0	100,0
7	AND 7	72,7	90,9
8	AND 8	0,0	100,0
9	AND 9	0,0	0,0
10	AND 10	25,0	75,0
11	AND 11	50,0	90,0
12	AND 12	53,3	100,0
13	AND 13	14,3	100,0
14	AND 14	0,0	94,1
15	AND 15	0,0	82,4
16	AND 16	26,3	94,7
17	AND 18	26,1	82,6
18	AND 19	23,8	90,5
19	AND 20	40,0	100,0
20	AND 21	0,0	90,9
21	AND 22	54,5	90,9
22	AND 23	0,0	81,8
23	AND 24	6,7	93,3
24	AND 25	83,3	100,0
25	AND 26	0,0	100,0
26	AND 27	0,0	100,0
27	AND 28	21,4	100,0
28	AND 29	62,5	81,3
29	AND 30	52,6	94,7
30	AND 31	37,5	100,0
31	AND 32	26,3	73,7
32	AND 33	0,0	100,0
33	APW 1	11,1	100,0
34	APW 2	58,3	100,0
35	APW 3	0,0	100,0
36	APW 4	0,0	100,0
37	APW 5	26,1	95,7
38	APW 6	4,3	100,0
39	APW 7	25,0	75,0
40	APW 8	50,0	90,0
41	APW 9	6,7	93,3
42	APW 10	18,8	68,8
43	APW 11	11,1	88,9
44	APW 13	43,8	100,0
45	APW 15	30,0	100,0
46	APW 16	21,4	100,0
47	APW 17	62,5	81,3
48	APW 46b	52,6	94,7
49	APW 49g	0,0	100,0

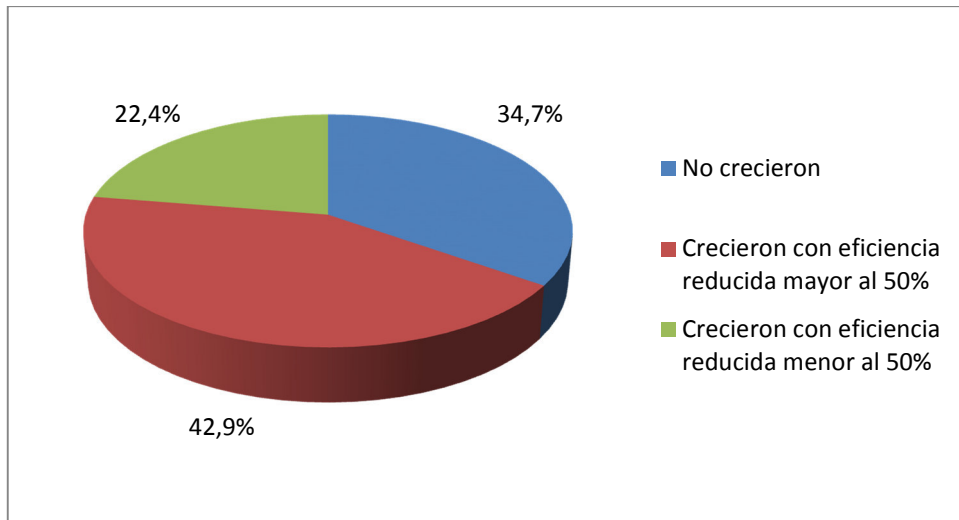


Figura 10. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a pH 5,5.

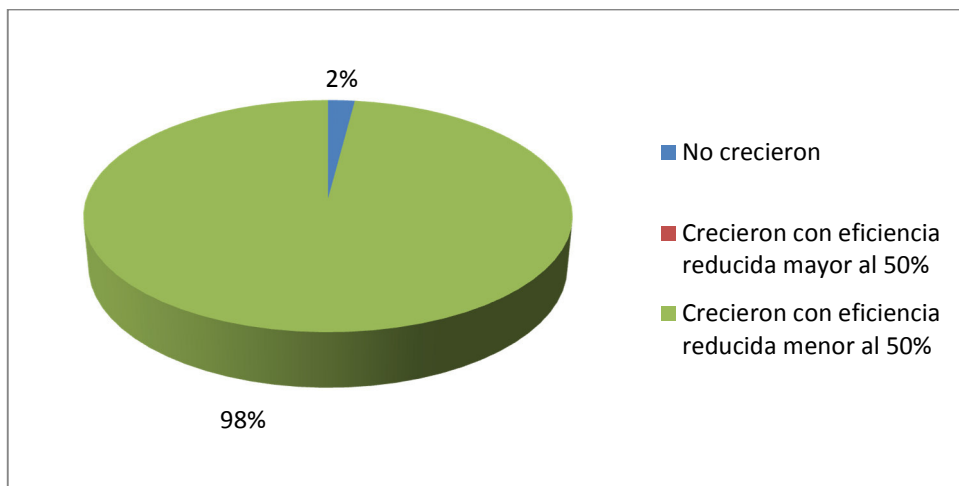


Figura 11. Porcentaje de cepas de actinomicetos en base a su crecimiento a pH 8,5.

Como ocurrió con la temperatura, el análisis de un grupo de cepas (del AND 15 al AND 20) reveló el tipo de respuesta fisiológica de los actinomicetos a la modificación del pH del medio. Como se aprecia en la figura 12, su crecimiento es más favorable cuanto mayor sea el pH, aun si este valor es superior al neutro. Este patrón de comportamiento se observa para la mayoría de actinomicetos del presente estudio.

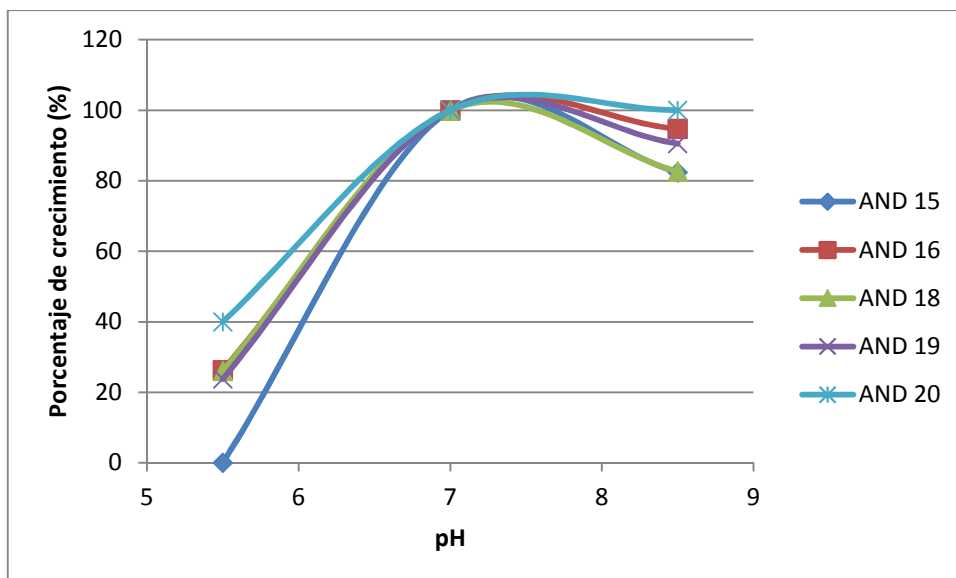


Figura 12. Crecimiento de los actinomicetos en función del pH.

5.4. Prueba de antagonismo en placa

Transcurrido el tiempo de incubación para este ensayo, se calcularon los porcentajes de inhibición siguiendo la técnica propuesta por Ahmed *et al.* (2007), la cual consiste en medir con ayuda de un calibrador Vernier la distancia del crecimiento entre el actinomiceto-hongo fitopatógeno, a la cual se le resta el radio de la colonia del actinomiceto, para finalmente dividirlo entre la distancia del crecimiento entre el actinomiceto-hongo fitopatógeno y multiplicarlos por 100. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 7.

De las 49 cepas de actinomicetos aislados, 42 (85,7%) presentaron, como mínimo, capacidad antagónica positiva frente a uno de los hongos fitopatógenos ensayados. Con respecto a la capacidad de inhibición frente a *Fusarium* sp., 34 cepas (69,4%) resultaron tener actividad antagonista contra este hongo (Figura 13). Los porcentajes de inhibición obtenidos varían entre 11,1 y 66,7 %, siendo la cepa 6 (AND 6) aquella que presentó el porcentaje de inhibición más alto.

Tabla 7. Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa frente a hongos fitopatógenos.

Nro de cepa	Código de cepa	Porcentaje de Inhibición frente a (% $\pm \sigma$)			
		<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
1	AND 1	22,2 \pm 0,1	76,9 \pm 0,1	22,2 \pm 0,0	14,3 \pm 0,2
2	AND 2	20,0 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0
3	AND 3	42,9 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0
4	AND 4	50,0 \pm 0,1	62,5 \pm 0,0	0,0	0,0
5	AND 5	0,0	0,0	0,0	0,0
6	AND 6	66,7 \pm 0,1	72,7 \pm 0,1	37,5 \pm 0,0	20,0 \pm 0,1
7	AND 7	60,0 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0
8	AND 8	50,0 \pm 0,1	28,6 \pm 0,0	40,0 \pm 0,0	22,2 \pm 0,0
9	AND 9	0,0	0,0	0,0	0,0
10	AND 10	0,0	0,0	0,0	0,0
11	AND 11	0,0	0,0	0,0	0,0
12	AND 12	62,5 \pm 0,1	57,1 \pm 0,1	40,0 \pm 0,1	16,7 \pm 0,0
13	AND 13	33,3 \pm 0,1	61,5 \pm 0,0	44,4 \pm 0,0	20,0 \pm 0,1
14	AND 14	50,0 \pm 0,2	70,0 \pm 0,1	33,3 \pm 0,1	14,3 \pm 0,0
15	AND 15	62,5 \pm 0,1	44,4 \pm 0,0	44,4 \pm 0,0	14,3 \pm 0,0
16	AND 16	50,0 \pm 0,0	70,0 \pm 0,1	0,0	0,0
17	AND 18	14,3 \pm 0,0	40,0 \pm 0,1	42,9 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1
18	AND 19	45,5 \pm 0,2	73,3 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1
19	AND 20	25,0 \pm 0,0	28,6 \pm 0,1	40,0 \pm 0,1	20,0 \pm 0,1
20	AND 21	22,2 \pm 0,1	33,3 \pm 0,1	33,3 \pm 0,1	14,3 \pm 0,1
21	AND 22	0,0	0,0	0,0	0,0
22	AND 23	0,0	22,2 \pm 0,1	22,2 \pm 0,1	0,0
23	AND 24	62,5 \pm 0,1	83,3 \pm 0,1	16,7 \pm 0,0	14,3 \pm 0,1
24	AND 25	16,7 \pm 0,1	50,0 \pm 0,1	50,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0
25	AND 26	25,0 \pm 0,1	44,4 \pm 0,1	40,0 \pm 0,1	14,3 \pm 0,1
26	AND 27	22,2 \pm 0,1	50,0 \pm 0,0	28,6 \pm 0,1	14,3 \pm 0,0
27	AND 28	16,7 \pm 0,1	0,0	16,7 \pm 0,1	0,0
28	AND 29	22,2 \pm 0,3	27,3 \pm 0,1	37,5 \pm 0,0	14,3 \pm 0,0
29	AND 30	0,0	0,0	33,3 \pm 0,1	0,0
30	AND 31	28,6 \pm 0,1	44,4 \pm 0,0	40,0 \pm 0,0	16,7 \pm 0,0
31	AND 32	0,0	0,0	62,5 \pm 0,1	0,0
32	AND 33	42,9 \pm 0,2	54,5 \pm 0,1	44,4 \pm 0,1	22,2 \pm 0,0
33	APW 1	0,0	0,0	33,3 \pm 0,1	0,0
34	APW 2	0,0	75,0 \pm 0,1	66,7 \pm 0,1	0,0
35	APW 3	0,0	0,0	50,0 \pm 0,2	0,0
36	APW 4	0,0	0,0	0,0	0,0
37	APW 5	57,1 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0
38	APW 6	50,0 \pm 0,0	0,0	0,0	0,0
39	APW 7	37,5 \pm 0,2	0,0	0,0	0,0
40	APW 8	22,2 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0
41	APW 9	57,1 \pm 0,0	0,0	0,0	0,0
42	APW 10	0,0	0,0	0,0	0,0
43	APW 11	0,0	0,0	44,4 \pm 0,1	0,0
44	APW 13	12,5 \pm 0,1	0,0	0,0	14,3 \pm 0,0
45	APW 15	22,2 \pm 0,1	0,0	0,0	20,0 \pm 0,1
46	APW 16	28,6 \pm 0,0	0,0	50,0 \pm 0,1	30,0 \pm 0,0
47	APW 17	25,0 \pm 0,0	0,0	0,0	20,0 \pm 0,0
48	APW 46b	11,1 \pm 0,1	0,0	0,0	0,0
49	APW 49g	0,0	0,0	0,0	14,3 \pm 0,0

σ : Desviación estándar



Figura 13. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a *Fusarium* sp. en Agar
Papa Dextrosa

En cuanto a la capacidad antagónica de actinomicetos frente a *Lasiodiplodia* sp., del total de aislados, 22 (44,9%) presentaron capacidad antagonista contra este hongo (Figura 14), cuyos resultados de inhibición varían entre 22,2 y 83,3 %, siendo la cepa 23 (AND 24) aquella que presentó el mayor porcentaje de inhibición.

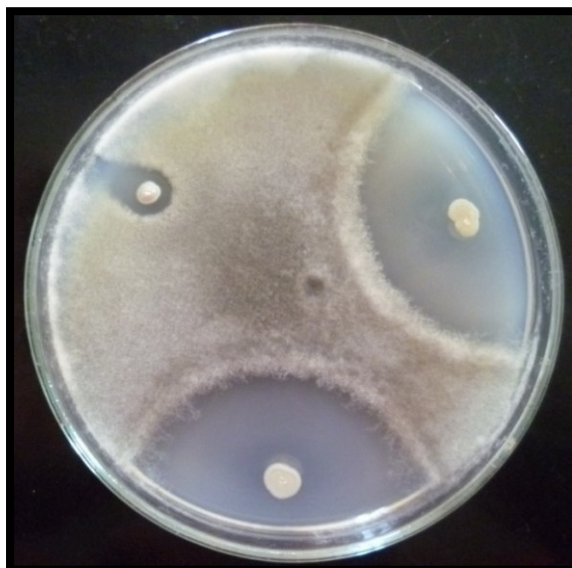


Figura 14. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a *Lasiodiplodia* sp. en Agar
Papa Dextrosa

Frente al hongo *Rhizoctonia solani*, se pudo observar que 27 (55,1%) aislados presentaron antagonismo contra este hongo (Figura 15), con porcentajes de inhibición que se encuentran entre 16,7 y 66,7%, siendo este último valor mostrados por la cepa 34 (APW 2).

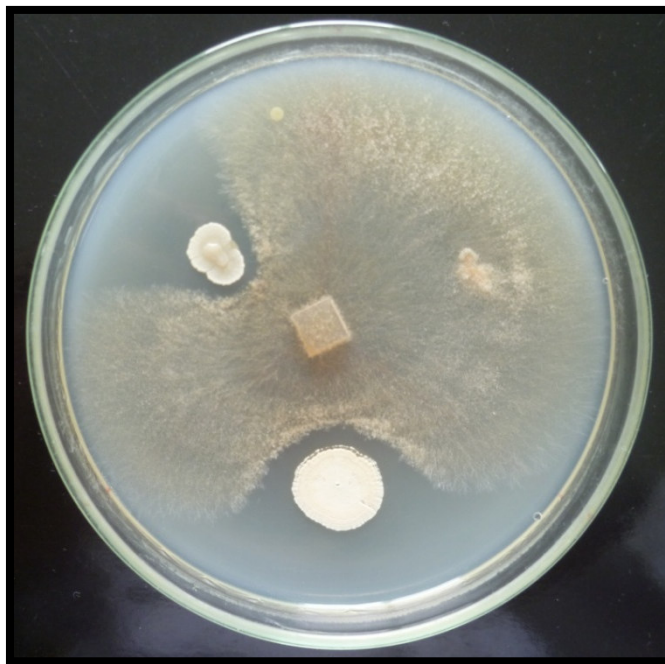


Figura 15. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a *Rhizoctonia solani* en
Agar Papa Dextrosa

En cuanto a la actividad antagónica de los actinomicetos frente a *Phytophthora infestans*, 23 (46,9%) aislados presentaron actividad contra este hongo (Figura 16), los cuales tuvieron resultados de inhibición que se encontraban entre 14,3 y 30,0 %, siendo la cepa 46 (APW 16) la que mostró el mayor valor.

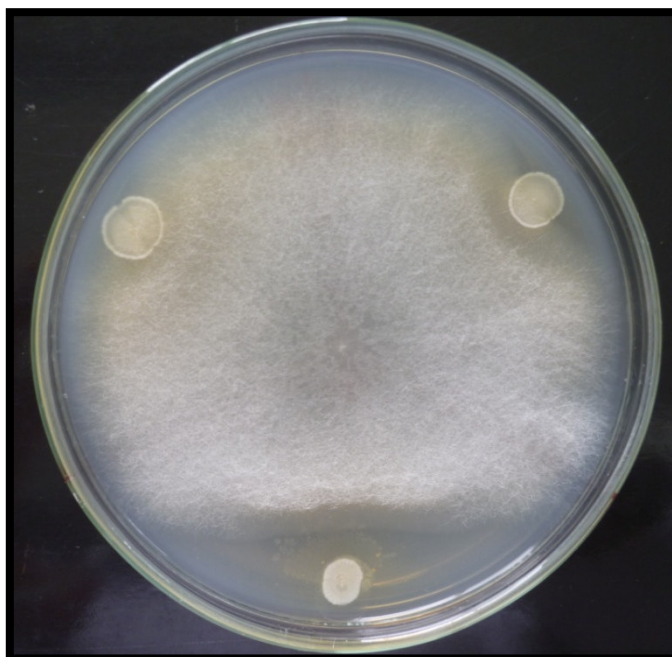


Figura 16. Prueba de antagonismo de actinomicetos frente a *Phytophthora infestans* en Agar Centeno

El mayor número de cepas presentó actividad antagonista frente a *Fusarium* sp. (69,4%), mientras que frente a *Phytophthora infestans* solo un grupo reducido de cepas presentó actividad antagónica positiva (38,8%). El mayor porcentaje de inhibición observado durante las pruebas de antagonismo se dio entre la cepa 23 (AND 24) y el hongo *Lasiodiplodia* sp. (83,3% de inhibición), mientras que los porcentajes de inhibición más bajos se dieron en los enfrentamientos contra *Phytophthora infestans* (Tabla 8).

Por otro lado, del total de cepas de actinomicetos aislados con capacidad antagónica positiva, solo 18 (36,7%) demostraron ser antagonista contra los 4 hongos (Figura 17).

Tabla 8. Síntesis de resultados de la capacidad antagonista de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa frente a hongos fitopatógenos.

Hongo fitopatógeno	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
Nro de cepas con actividad positiva (%)	34 (69,4%)	22 (44,9%)	27 (55,1%)	23 (46,9%)
Porcentaje de inhibición más alto hallado	66,7%	83,3%	66,7%	30,0%
Cepa con mayor actividad	6 (AND 6)	23 (AND 24)	34 (APW 2)	46 (APW 16)

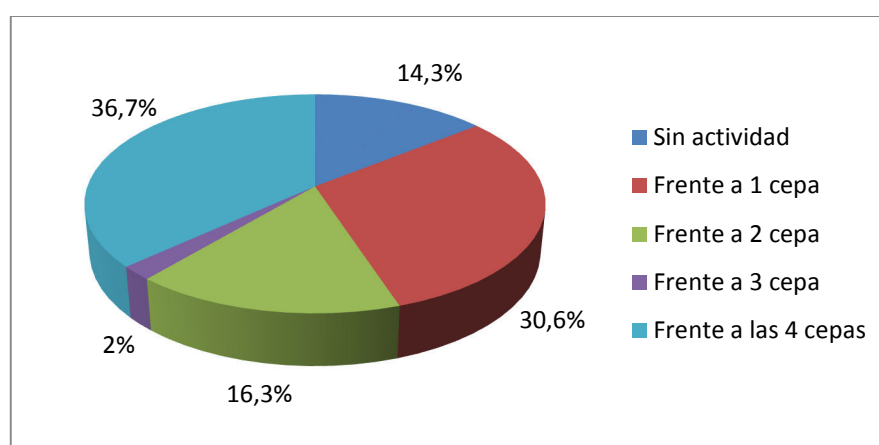


Figura 17. Porcentaje de cepas con capacidad antifúngica según el número de fitopatógenos con los que presenta actividad positiva.

5.5. Determinación de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos

La cepa 23 (AND 24) fue elegida para la preparación de extractos orgánicos y su posterior ensayo de determinación de actividad antifúngica, debido a su capacidad antagonista frente a los cuatro hongos evaluados, y sus elevados porcentajes de inhibición frente a dos de las cuatro cepas.

Los solventes utilizados para la extracción de los metabolitos presentes en el medio de cultivo fueron elegidos tomando en cuenta su polaridad y su punto de ebullición. Las características químicas básicas de cada uno de ellos se encuentran en la tabla 9.

Los extractos obtenidos fueron concentrados hasta la obtención de los pesos secos de cada cepa (Tabla 10). Posteriormente, los extractos se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% para la realización del ensayo en placa, la cual contenía pocillos de 5 mm de diámetro, donde se colocó 0,5 ml de extracto orgánico. Al término de los 5 días de incubación, se realizó la lectura de las placas, siguiendo la técnica propuesta por Pandey *et al.* (2004). Se tomó como control negativo al DMSO.

Tabla 9. Aspectos químicos de los solventes orgánicos utilizados

Solvente	Etil acetato	Diclorometano	Hexano	Butanol
Nombre IUPAC	Acetato de etilo	Cloruro de metileno	n-hexano	Butan-1-ol
Tipo de compuesto	Éster	Haloalcano	Hidrocarburo alifático alcano	Alcohol
Formula semidesarrollada	CH ₃ -COO-CH ₂ -CH ₃	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH
Polaridad	Polar aprótico	Polar aprótico	No polar	Polar prótico
Punto de ebullición	77 °C	40 °C	69 °C	118 °C

Tabla 10. Extracto orgánico obtenido del cultivo de la cepa AND 24

	Etil acetato	Diclorometano	Hexano	Butanol
Peso seco (mg)	8,2	6,3	2,5	11,6

Los extractos obtenidos con etil acetato (Figura 18) y diclorometano presentaron un halo de actividad antifúngica contra la misma cepa de hongo fitopatógeno, *Lasiodiplodia* sp., aunque con un mayor valor en el caso del etil acetato (12 mm) a comparación del diclorometano (10 mm). Ambos extractos no presentaron ningún tipo de actividad antifúngica contra las otras tres especies de hongos evaluadas.

En el caso del extracto obtenido con butanol, solo se pudo comprobar actividad antifúngica positiva frente a *Fusarium* sp. (Figura 19), alcanzando un halo de inhibición de 12 mm. Finalmente, el extracto obtenido con hexano no presentó actividad

antifúngica frente a los cuatro hongos del estudio. La síntesis de resultados se puede observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de la cepa AND 24.

Solvente orgánico	Halo de inhibición frente a (mm)			
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
Etil acetato	0,0	12	0,0	0,0
Diclorometano	0,0	10	0,0	0,0
Hexano	0,0	0,0	0,0	0,0
Butanol	12	0,0	0,0	0,0

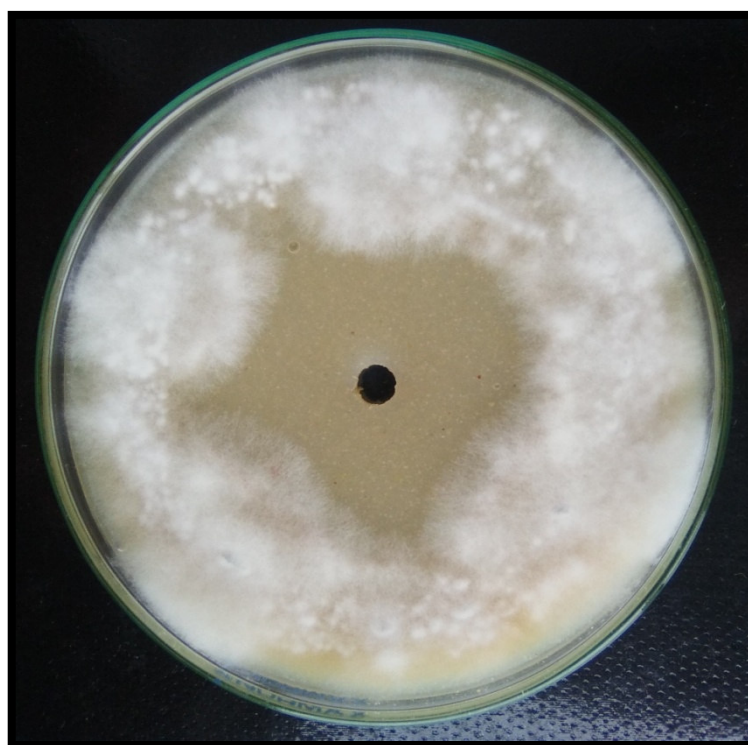


Figura 18. Actividad antifúngica del extracto obtenido con etil acetato del actinomiceto AND 24 frente a *Lasiodiplodia* sp.

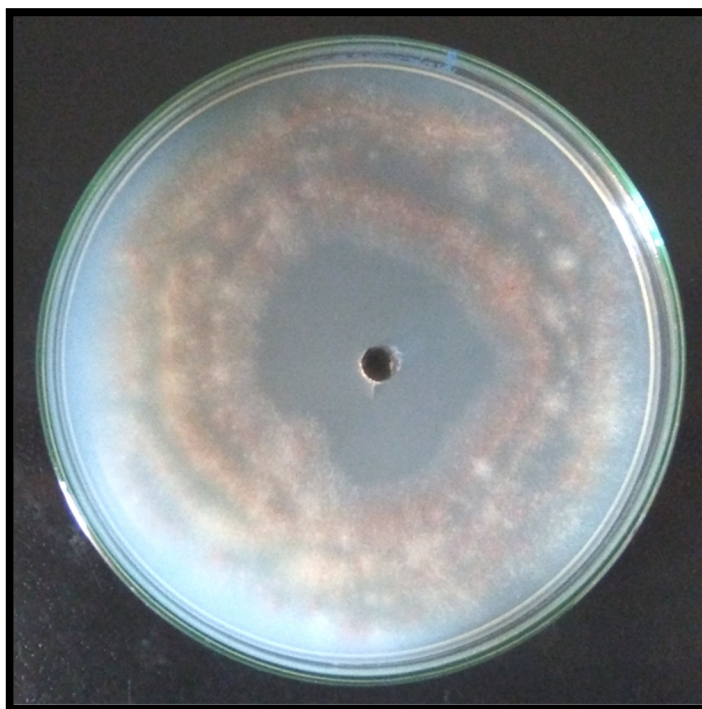


Figura 19. Actividad antifúngica del extracto obtenido con butanol del actinomiceto AND 24 frente a *Fusarium* sp.

5.6. Análisis estadístico

La tabla 12 está conformada por las fuentes de variabilidad, la suma de cuadrados, los grados de libertad (gl), las medias cuadráticas, el estadístico de prueba (F) y la significancia observada (p) asociado a cada estadístico F, siendo la variable independiente el porcentaje de inhibición.

Como se puede observar, entre los hongos fitopatógenos y los porcentajes de inhibición se observa una diferencia significativa de la actividad inhibitoria, puesto que el estadístico F lleva asociado un valor $p < 0,05$, lo cual indica que las interacciones entre los factores poseen un efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición.

Tabla 12. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de varianza (ANOVA) para porcentaje de inhibición

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Hongos fitopatógenos	8735,574	3	2911,858	6,134	,001
Porc. De inhibición	91144,091	192	474,709		
Total	99879,666	195			

Considerando la diferencia significativa observada entre los factores evaluados se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13. Subconjuntos homogéneos – DHS de Tukey generales (Hongos fitopatógenos frente a porcentajes de inhibición)

	Fitopatógeno	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	<i>P. infestans</i>	49	8,3837	
	<i>R. solani</i>	49		21,1082
	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	49		23,8776
	<i>Fusarium</i> sp.	49		25,2490
	Sig.		1,000	,783
Tukey B ^a	<i>P. infestans</i>	49	8,3837	
	<i>R. solani</i>	49		21,1082
	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	49		23,8776
	<i>Fusarium</i> sp.	49		25,2490

En la comparación de medias de los porcentajes de inhibición frente a los hongos fitopatógenos del estudio, la tabla 13 demuestra que frente a *Phytophthora infestans* se presentan el porcentaje de inhibición más bajo con respecto a la media (8,3837%, el cual además difiere significativamente de los demás valores calculados), seguido de los porcentajes frente a *Rhizoctonia solani* (21,1082%) y *Lasiodiplodia* sp. (23,8776%),

mientras que el mayor valor se observó frente a *Fusarium* sp. (25,2490%) en la media de los porcentajes de inhibición, lo cual indica que los actinomicetos presentan una buena acción inhibitoria frente a este fitopatógeno.

Tabla 14. Intervalos generales de confianza al 95% ((Hongos fitopatógenos frente a porcentajes de inhibición)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Fusarium</i> sp.	49	25,2490	22,23282	3,17612	18,8630	31,6350	,00	66,70
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	49	23,8776	29,37371	4,19624	15,4404	32,3147	,00	83,30
<i>R. solani</i>	49	21,1082	21,29079	3,04154	14,9927	27,2236	,00	66,70
<i>P. infestans</i>	49	8,3837	9,40340	1,34334	5,6827	11,0846	,00	30,00
Total	196	19,6546	22,63191	1,61657	16,4664	22,8428	,00	83,30

La tabla 14 presenta los resultados obtenidos al analizar el porcentaje de inhibición de los actinomicetos sobre el desarrollo de los hongos fitopatógenos, resaltando el efecto sobre el crecimiento sobre *Fusarium* sp., donde se observó el mayor valor de la media del porcentaje de inhibición, el cual fue de 25,2490%, con límites entre 18,8630% $\leq \mu \leq$ 31,6350%. Con excepción de los resultados frente a *Phytophthora infestans*, para los demás ensayos con los hongos evaluados, el intervalo de confianza al 95% presenta límites entre los cuales los datos de los porcentajes de inhibición se traslapan entre sí, es decir, comparten valores de porcentajes de inhibición.

5.7. Caracterización microscópica del actinomiceto AND 24

Las cepas que mostraron los mejores resultados del antagonismo fueron fijadas a unas láminas, deshidratadas, secadas y montadas a unos portaobjetos para posteriormente ser recubiertas con metal y estar listas para la observación mediante el Microscopio Electrónico de Barrido.

En el caso de la cepa 23 (AND 24), se pudo notar la presencia de hifas con adecuada turgencia, que se ramifican y dan origen a cadenas de esporas cortas con forma de

espiral, de manera análoga a lo observado en las láminas de microcultivo, con lo que se confirmó que el aislado se trata de una cepa de *Streptomyces* sp. En cuanto a las esporas, que se disponían de manera abundante en casi todos los campos observados, presentaban forma cocobacilar.

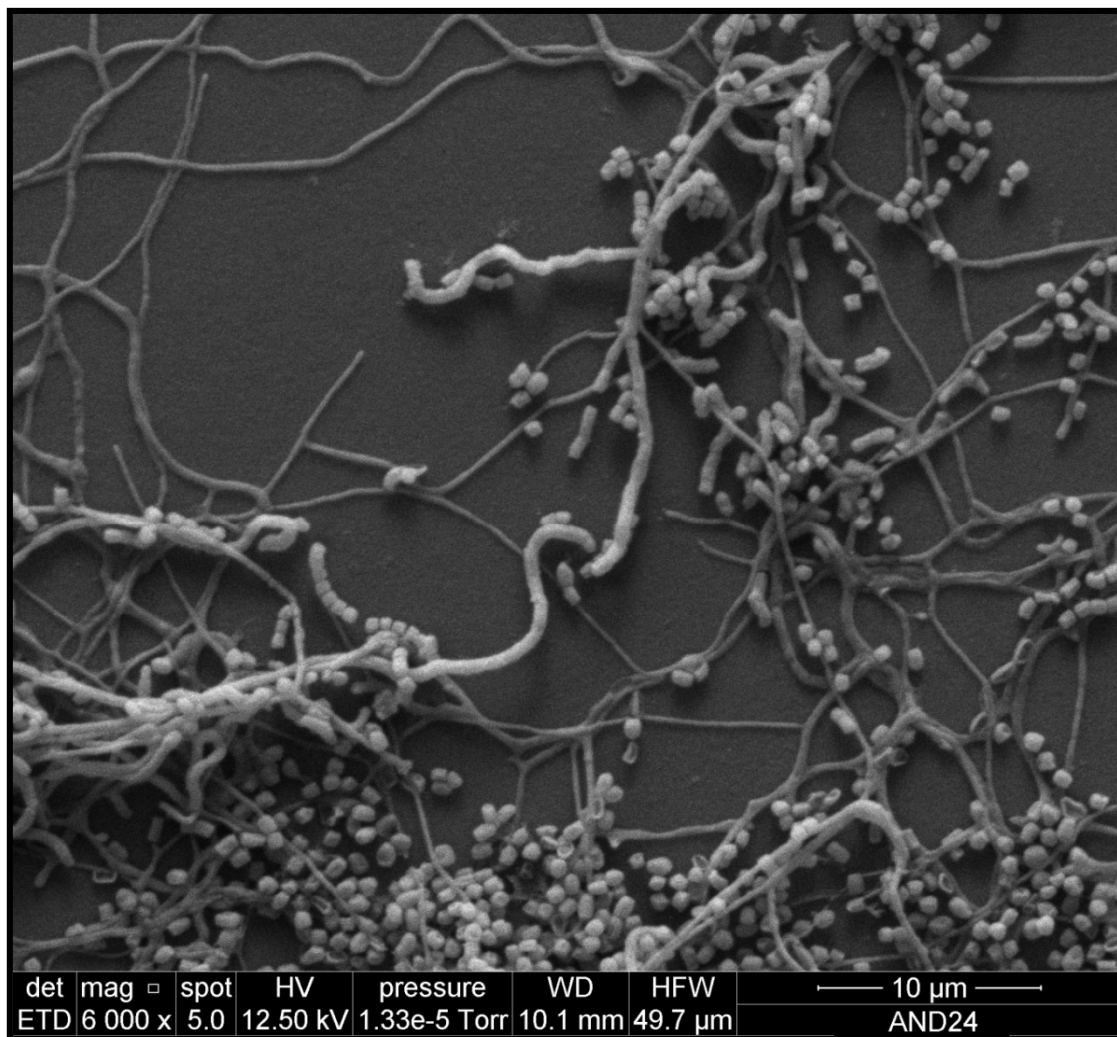


Figura 20. Imagen del Microscopio Electrónico de Barrido del actinomiceto AND 24.

5.8. Análisis del ADNr 16S del actinomiceto AND 24

Luego de confirmar el producto amplificado por PCR del ADNr 16S, cuyo tamaño aproximado es de 1500 pb observado por electroforesis en gel de agarosa, este fue enviado a MACROGEN KOREA para su secuenciamiento.

La secuencia recibida fue limpiada para obtener la secuencia consenso mediante el programa BioEdit, y una vez lista se realizó la alineación múltiple de la secuencia problema del AND 24 con un total de 25 secuencias de ADNr 16S descargadas de la base de datos del GenBank con el programa CLUSTAL X Versión 2.1. 24 de estas secuencias pertenecen a especies de actinomicetos, mientras que la última secuencia utilizada como grupo externo pertenece a *Bacillus subtilis*. El árbol filogenético se obtuvo con el programa MEGA7 usando el método de Neighbor-Joining (Figura 22). En el árbol filogenético se observa que la cepa AND 24 tenía una distancia de igual valor con 3 cepas de actinomicetos (*Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces sampsonii*), sin embargo, el análisis mediante la herramienta BLASTN reveló un máximo porcentaje de homología de 99% con la especie *Streptomyces sampsonii* ATCC 25495 (Anexo 8).

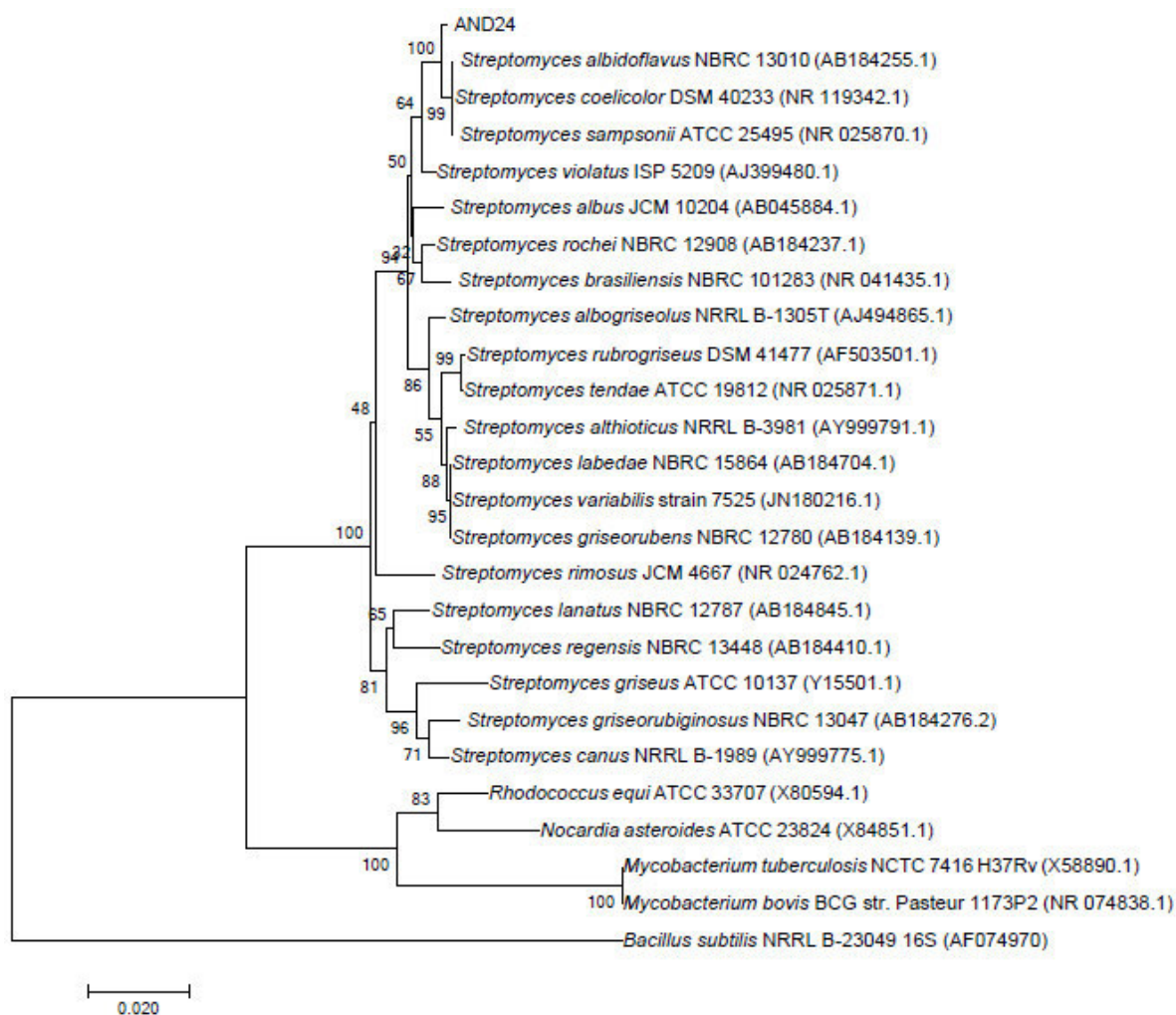


Figura 21. Árbol filogenético del ADNr 16S de la cepa AND 24 y 24 secuencias de actinomicetos. Se usa como grupo externo a *Bacillus subtilis*.

6. DISCUSIÓN

A pesar de que a nivel mundial se reconoce el gran potencial que tienen los actinomicetos como productores de metabolitos secundarios de importancia biotecnológica, tales como los antibióticos y enzimas extracelulares (Arasu *et al.*, 2008), en nuestro medio aún hay pocos estudios de investigación sobre los grandes aportes que nos pueden proporcionar estos microorganismos, tales como su posible aplicación en el control biológico de fitopatógenos.

En la primera parte del presente trabajo se logró obtener una gran cantidad de cepas de actinomicetos provenientes de la rizósfera de *S. tuberosum*. Autores como Tsavkelova *et al.* (2006) señalan que los exudados de las raíces de las plantas atraen por quimiotaxis a una diversidad de géneros bacterianos, tales como *Agrobacterium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, con los cuales las plantas establecen una relación estrecha no simbiótica de colonización epifítica, la que estimula y facilita el crecimiento vegetal directamente por la producción de moléculas tales como las fitohormonas. Sin embargo, según lo mencionado por Franco (2009), a diferencia del primer grupo mencionado anteriormente, los actinomicetos presentan un segundo tipo de relación con las plantas, la cual se produce por la síntesis de moléculas con actividad antimicrobiana que protegen a la raíz de la planta de la invasión de ciertos patógenos, por lo que los actinomicetos se consideran promotores de crecimiento vegetal indirecto.

Aunque existe una amplia gama de microorganismo pertenecientes al Orden de los Actinomycetales, los métodos de aislamiento convencionales han demostrado que por lo menos el 90% de los actinomicetos aislados a partir del suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Smaoui *et al.*, 2011). Esta premisa concuerda con los resultados obtenidos en la caracterización morfológica de los actinomicetos, puesto que la gran mayoría presentaba características compatibles al género *Streptomyces*, las cuales

presentan crecimiento en la superficie del medio de cultivo como colonias de aspecto pulverulento, de color blanco grisáceo, consistencia dura y pigmento difusible variado, y que al observar en microcultivo se observan cadenas de conidias que no se fragmentan (Goodfellow *et al.*, 2012). Además, la caracterización bioquímica utilizando los medios del ISP refuerzan el hecho de que los aislados se tratan de *Streptomyces* sp. Sin embargo, las pruebas son insuficientes para determinar la especie de alguna de ellas, concordando lo mencionado por Taddei *et al.* (2006).

Complementariamente, se realizaron otras pruebas de caracterización bioquímica para obtener un perfil metabólico más completo de las cepas del presente estudio. La prueba de asimilación de azúcares nos demostró que casi la mitad de los aislados de este trabajo (45%) pueden utilizar los tres azúcares ensayados, los cuales son glucosa, manitol y sacarosa. Rico (2009) trabajando con los mismos azúcares, y en comparación a este estudio, solo el 15% de sus aislados pudo utilizar la totalidad de azúcares. A pesar que en ambos estudios se trabajó con muestras de rizósfera de papa, la razón de esta gran diferencia entre los resultados en cuestión podría deberse a que las muestras de ambos trabajos se obtuvieron de diferentes localidades, distintos tipos de suelo y con condiciones fisicoquímicas completamente diferentes, que según lo citado por Killian *et al.* (2001) afectaría en gran magnitud a los tipos de poblaciones microbianas que se pueden establecer en ambos nichos ecológicos.

En cuanto a la capacidad de síntesis de enzimas extracelulares, los resultados con respecto a la capacidad amilolítica nos revelan una alta tasa de cepas productoras de esta enzima (89,9%), valor que comprueba lo dicho por Sharma (2014) sobre la potente capacidad enzimática de este grupo microbiano. En contraste con los resultados, León *et al.* (2007) encuentra un porcentaje de actinomicetos productores de amilasas muy cercano (92%), aunque el origen de las cepas ensayadas del estudio mencionado son de origen marino.

Una diferencia sustancial es observada en cuanto a la producción de amilasas con respecto a las celulasas de las cepas ensayadas. Se determinó que solo un 26,5% tenía actividad celulolítica; un valor considerablemente distinto a lo reportado por Ramírez y Coha (2003), quienes reportan en su estudio que el 51,8% de actinomicetos eran celulolíticos, aunque incluían en su totalidad cepas termofílicas. Este último aspecto podría ser la causa de la baja tasa de actividad celulolítica encontrada, puesto que se ha reportado que las enzimas celulolíticas poseen una temperatura óptima de reacción a los 40 °C (Marín, 2007), mientras que los ensayos de determinación enzimática realizados en este trabajo se hicieron a temperaturas de incubación de 28 °C.

Los resultados concernientes a las pruebas de caracterización fisiológica también nos revelan datos interesantes. Primero, se evaluó la capacidad del crecimiento de los actinomicetos a bajas temperaturas. Los resultados mostraron que a 4 °C, un 24,5% no pudo crecer luego de un periodo de 15 días, mientras que a 20 °C la totalidad de aislados pudieron crecer sin ningún problema y la mayoría a su máximo rendimiento. Rico (2009), quien realizó un estudio similar, reporta que a 10 °C todas sus cepas pudieron crecer, aunque un elevado porcentaje (65%) disminuyó su eficiencia de crecimiento con respecto al control. En cuanto a la evaluación a la temperatura de 20 °C, en el presente trabajo se obtuvo que solo un 6,1% de las cepas redujo su crecimiento en más del 50% a comparación del control a 28 °C, valor menor a la mitad del porcentaje obtenido por Rico (2009), el cual fue de 15%. Puesto que la papa se cultiva en ambientes que poseen una temperatura promedio de 18 a 20 °C, debido a que a esa temperatura el tubérculo presenta una mayor tasa de brote y emergencia (Ministerio de agricultura y riego, 2014), aparentemente este no representaría ningún problema para la aplicación de cepas como bioinóculo en los cultivos con el fin de promover el crecimiento vegetal, prevenir o suprimir a los patógenos. Sin embargo, cabe recalcar que a pesar que la temperatura a 20 °C no represente problema en el

desarrollo de los actinomicetos, si podría serlo en la producción de metabolitos secundarios benéficos (Agarwal y Mathur, 2016), por lo que se debe evaluar este aspecto antes de la aplicación en campo.

En cuanto a la evaluación del crecimiento a diferentes pHs, la evaluación a pH 5,5, casi una tercera parte de los actinomicetos (34,7%) no desarrollaron colonias en placa luego de 8 días, y un alto porcentaje de las que sí lo hicieron tuvieron un rendimiento menor al 50% con respecto al control (42,9%). En contraste con estos resultados, Rico (2009) encuentra que la totalidad de sus aislados pudieron crecer a pH 5,5, e inclusive todas también mostraron un rendimiento de crecimiento mayor del 50% con respecto al control. La diferencia entre ambos estudios tiene mucho que ver con las características del suelo de donde se aislaron los actinomicetos, que si bien es cierto ambos provienen de la rizósfera de papa, el estudio de Rico (2009) obtiene muestras de suelo con pHs bastante bajos, llegaron el menor de ellos a 4,06. Además de ellos, los actinomicetos aislados en el presente estudio presentaron muy buena respuesta frente a un pH de 8,5, puesto que el 98% creció sin ningún problema y con un rendimiento de crecimiento superior al 50%, con que se puede decir que los actinomicetos encontrados en la rizósfera de los cultivos de papa de Andahuaylas parecen ser mayormente alcalotolerantes. Según lo detallado por el Ministerio de agricultura y Riego (2014), los suelos con pHs entre 5,2 a 7,5 son los ideales para el cultivo del tubérculo de papa, por lo que este factor sería una limitante para la aplicación de actinomicetos como inoculante microbiano.

Las pruebas más importantes del estudio fueron los ensayos de antagonismo en placa contra hongos fitopatógenos de la papa. En relación a los resultados obtenidos con *Fusarium* sp., se encontró que 34 aislados (69,4%) mostraron capacidad antagónica frente al agente causal de la pudrición seca, un resultado cercano a lo reportado por Rico (2009), quien halló que un 48% de los actinomicetos ensayados presentaban actividad positiva frente a este hongo. Caso contrario se observa en el trabajo de

Pérez *et al.* (2015), quienes reportan solo un 25,8% de cepas con actividad antagonica frente a *Fusarium* sp. La discrepancia en los resultados podría deberse a que los actinomicetos aislados por Pérez *et al.* provienen del compost y no de la rizósfera, es decir, una variación del origen de la muestra. Sin embargo, los máximos valores de halos de inhibición obtenidos por Pérez *et al.* tienen un valor equivalente al encontrado en el presente estudio, en otras palabras, una zona de inhibición de 18 mm, equivalente a un porcentaje de inhibición de 66,7%.

Para el caso de la capacidad antagonica de los actinomicetos frente a *Lasiodiplodia* sp., se obtuvo que un 44,9% de las cepas evaluadas mostraron actividad positiva frente a este hongo. Un valor más bajo es el reportado por Sajitha y Florence (2013), quienes demuestran solo un total de 20,7% de cepas con capacidad antagonica frente al hongo de la pudrición negra en su estudio. Puesto que la cantidad de cepas evaluadas en ambos estudios tienen valores bastante cercanos, la diferencia se da por el tipo de muestra de la que se han aislado los actinomicetos en ambos estudios. Pese a ello, el máximo valor de inhibición dado por Sajitha y Florence es de 77,8%, valor que se acerca bastante al obtenido en el presente trabajo, que es de 88,3%, y que además corresponde al mayor valor de inhibición de todos los ensayos de antagonismo realizados aquí. Cabe resaltar que a pesar de ser mencionado como patógeno de tubérculos y otras hortalizas (Ames, 1997; Alama *et al.*, 2006; Tovar *et al.*, 2013), en nuestro país aún no hay importantes indicios de esta plaga en la papa, y además, este trabajo constituye uno de los primeros en reportar la actividad antagonica de los actinomicetos frente a *Lasiodiplodia* sp.

Por otro lado, en referencia a los resultados de antagonismo mostrados frente a *Rhizoctonia solani*, se encontró que un 55,1% de los actinomicetos demostraban actividad positiva contra este fitopatógeno. Numerosos estudios ya han reportado la efectividad de los actinomicetos contra el fitopatógeno en cuestión, con buenos valores de porcentaje de inhibición, estudios que han sido desarrollados debido a que

Rhizoctonia solani y especies afines son un importante problema como fitopatógeno afectando a varios grupo de tubérculos y hortalizas en el campo (Castillo, 2004; Dávila *et al.*, 2008; Farfán y Gutiérrez, 2009). Para el Perú, el resultado de este estudio es congruente con lo reportado por Rico (2009) quien demuestra la efectividad del 42,2% de actinomicetos aislados contra *Rhizoctonia solani*. Pérez *et al.* (2015) obtienen un resultado similar, aunque ligeramente mayor, de actinomicetos con actividad antifúngica frente a *Rhizoctonia solani* (61,2%). Sin embargo, el máximo valor de inhibición obtenido frente a esta cepa fue de 66,7%, el cual es ligeramente inferior a lo reportado por Rico (2009). Cabe mencionar que si bien se cuenta con un buen número de trabajos enfocados al fitopatógeno causante de la costra negra y su antagonismo frente a los actinomicetos, según lo mencionado por García *et al.* (2002), el hongo *Trichoderma harzianum* ha sido probado y usado con éxito en el control de *R. solani* en diversos cultivos de hortalizas, por lo que representa la principal alternativa en el control de la enfermedad por este fitopatógeno.

Por su parte, un 46,9% de los actinomicetos que se aislaron presentaron actividad positiva contra *Phytophthora infestans*. Presentado como el agente causal de la enfermedad más devastadora de los cultivos de papa denominada el tizón tardío, al igual que para *Rhizoctonia solani*, viene siendo uno de los importantes temas de estudio en el campo de la sanidad agrícola (Fry, 2008). Realizando un análisis comparativo, Fonseca *et al.* (2011) encuentran que del total de actinomicetos que evalúan, solo el 32% presenta actividad *in vitro* positiva frente a *P. infestans*. Cabe mencionar que los actinomicetos de su estudio fueron aislados de residuos orgánicos de chipaca (*Bidens pilosa*). En cuanto al trabajo realizado por Pérez *et al.* (2015), los reportes dados mencionan un 42,4% del total de aislados con actividad antifúngica frente a *P. infestans*. Si bien el porcentaje de cepas con actividad positiva es casi similar al del presente estudio, no lo es así con los máximos valores de inhibición, puesto que aquí se encontraron valores bajos de porcentaje de halos de inhibición,

siendo el máximo para el caso de *P. infestans* de 30%, mientras que para Pérez *et al.* (2015) el máximo valor alcanza los 22 mm, equivalente a un 77,3%. La explicación a esta diferencia de resultados podría estar en el hecho que esta especie presenta los denominados grupos de anastomosis, de los cuales se puede mencionar que algunos grupo son más patógenos que otros, e incluso se menciona que ciertos grupos son mucho más resistentes a los antibióticos (Cherepennikova *et al.*, 2002). De haberse dado este posible escenario, puede que en ambos trabajos se haya utilizado grupos de anastomosis que conllevaron a esta variación en los resultados de las pruebas de antagonismo.

Evaluando en conjunto los resultados anteriores, pero en especial los altos valores de porcentajes de inhibición frente a los hongos fitopatógenos, la cepa AND 24 fue seleccionada para la obtención de extractos orgánicos y el ensayo de actividad antifúngica. Se emplearon cuatro solventes de distintas polaridades, de los cuales solo el extracto orgánico obtenido con tres de ellos presentaron halos de actividad antifúngica, y además, la actividad solo se pudo comprobar con dos de las cuatro cepas de hongos fitopatógenas empleadas en el estudio.

El primer caso se da con el hongo *Fusarium* sp. El extracto obtenido con butanol nos revela un halo de inhibición de 12 mm, mientras que el extracto obtenido con los demás solventes no muestran ningún tipo de actividad antifúngica denotada por algún halo alrededor de los pocillos. Existen diversas posibles razones para el resultado negativo obtenido con los demás solventes. La primera de ellas es el método de extracción utilizado. Tal como lo menciona Ruiz (2008), el método de extracción por solvente es un proceso que reduce los costos del análisis, contaminación y tiempo del estudio, pero por otra parte, la cantidad de sustancia que se obtenga puede ser relativamente poca en comparación a otros métodos. La segunda explicación tiene que ver con la polaridad del solvente utilizado, puesto que dependiendo de la

naturaleza química del metabolito de interés y la afinidad de la sustancia por el solvente (polaridad) permitirán su obtención y posterior detección (Ocampo, 2011).

Los resultados obtenidos de la evaluación de extractos orgánicos obtenidos de actinomicetos frente a *Fusarium* sp. por Pérez *et al.* (2015), quienes utilizan etil acetato y diclorometano como solventes, revelan que se obtuvo mejor actividad inhibitoria con los extractos recuperados con etil acetato.

Ahora, con respecto a lo observado en los ensayos frente a *Lasiodiplodia* sp., es de resaltar que se demuestra actividad antifúngica frente a los extractos obtenidos con etil acetato (12 mm) y diclorometano (10 mm), mientras que para los dos solvente restantes no se revela ningún tipo de actividad. La explicación más evidente para los resultados negativos con los extractos orgánicos de hexano y butanol tienen que ver con la afinidad del principio activo a la polaridad del solvente, puesto que tanto el etil acetato como el diclorometano son solvente polares apróticos.

En cuanto a ensayos de evaluación de solventes por otros autores, Leiva *et al.* (2004) quienes trabajan con actinomicetos marinos, obtienen extractos con cinco solventes, los cuales son éter de petróleo, cloroformo, etilmetilcetona, etil acetato y butanol, encontrando los mejores resultados con los extractos obtenidos con etilmetilcetona y etil acetato frente a bacterias Gram positivas. Dhanasekaran *et al.* (2005) consigue obtener extractos orgánicos de actinomicetos de salinas, comparando los resultados obtenidos con anilina, cloroformo, piridina y etil acetato frente a bacterias Gram negativas, reportando una mayor actividad antibacteriana con los extractos obtenidos con anilina y etil acetato. Remya y Vijayakumar (2008), quienes también trabajan con actinomicetos aislados de sedimentos marinos, utilizan al etil acetato, metanol, cloroformo y etanol para la obtención de extractos orgánicos, obteniendo los valores más altos con los obtenidos con etil acetato frente a los Gram positivos. Todos estos resultados señalan al etil acetato como el mejor solvente en la recuperación de los

metabolitos activos producidos por actinomicetos. Además, se conoce que el etil acetato arrastra a las sustancias que tienen mayor polaridad, que a su vez, son las que poseen la mayor actividad antimicrobiana (Okeleye *et al.*, 2010). Esta última premisa encaja con el resultado obtenido en la evaluación de los distintos extractos orgánicos frente a *Lasiodiplodia* sp., puesto que se obtuvo un mayor halo de inhibición con el obtenido usando etil acetato como solvente, corroborando lo reportado con los estudios previos.

Finalmente, se realizaron estudios complementarios para identificar al actinomiceto AND 24. Los estudios con microscopía electrónica permitieron comprobar los resultados obtenidos con la caracterización morfológica y bioquímica como cepa perteneciente al género *Streptomyces*. Tomando en cuenta todos los datos recopilados hasta este punto, el árbol filogenético reveló una distancia evolutiva de igual valor entre la cepa AND 24 con *S. albidoflavus*, *S. coelicolor* y *S. sampsonii*; sin embargo, tomando como referencia a las descripciones de estas tres especies brindadas por el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Goodfellow *et al.*, 2012), el perfil descrito para *Streptomyces sampsonii* es el que se ajusta mejor a lo hallado en el presente estudio (Gram positiva, de colonias color amarillo o gris pálido, con cadenas de esporas largas, reductora de nitratos a nitritos, capaz de utilizar fuentes carbonadas como glucosa, manitol y sacarosa, buen crecimiento a temperaturas entre 15-42 °C y pH entre 5-10, pero inhibido a temperaturas menores a 4 °C, sobre 55 °C y pH 4), con lo cual se presume que se trataría de esta especie. Además, ha sido reportado como productor de sustancias antifúngicas frente a patógenos humanos como la levadura *Candida albicans* y los mohos *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton* sp. (Kumar y Jain, 2007). Este estudio corrobora la capacidad antifúngica de *S. sampsonii*, pero añade su espectro de actividad frente a cepas fitopatógenas.

La realización de pruebas complementarias de caracterización fenotípicas y fisiológicas, así como la evaluación de otro marcador molecular, tal como la secuencia parcial del gen de la subunidad β del ARN polimerasa (*rpoB*), permitiría esclarecer las relaciones filogenéticas de la cepa AND 24 y brindar un resultado más preciso en la determinación de la especie (Kim *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a lo largo de la investigación realizada, este estudio sugiere la utilización de este grupo de actinomicetos en cultivos como bioinoculantes microbianos, debido a su actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos, su rol como promotor de crecimiento vegetal indirecto, como alternativa frente al uso de agroquímicos y con ellos proteger la salud del agricultor, reducir la contaminación ambiental y el deterioro de los campos de cultivo, la disminución de la resistencia de los fitopatógenos y aumentar la producción y calidad de los tubérculos de papa.

7. CONCLUSIONES

1. Es posible aislar gran cantidad de bacterias nativas del grupo de los actinomicetos de la rizósfera de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* de las zonas altoandinas del Perú con potencial antagonismo frente a hongos fitopatógenos de la papa.
2. En base a las pruebas de caracterización fenotípica y microscópica, todas las cepas aisladas del grupo de los actinomicetos pertenecen al género *Streptomyces*.
3. De acuerdo a los resultados de los ensayos de antagonismo en placa, la mayor parte de los actinomicetos aislados presentaron actividad antifúngica frente a por lo menos una cepa de hongo fitopatógeno. El mayor número de cepas con capacidad antifúngica fue frente a *Fusarium* sp., mientras que los mayores valores de porcentaje de inhibición se alcanzaron frente a *Lasiodiplodia* sp.
4. El extracto obtenido con etil acetato presentó la mayor actividad antifúngica frente a *Lasiodiplodia* sp., mientras que el extracto butanólico mostró efecto antifúngico sobre *Fusarium* sp.
5. El análisis filogenético del actinomiceto AND 24, quien demostró su capacidad antagónica frente a los cuatro hongos fitopatógenos evaluados, reveló que probablemente se trata de una cepa de la especie *Streptomyces sampsonii*, de la cual se ha demostrado su actividad antifúngica frente a patógenos humanos, y ahora también frente a fitopatógenos de la papa.
6. Los actinomicetos rizosféricos de la papa son excelentes productores de compuestos bioactivos capaces de inhibir notablemente el desarrollo de hongos fitopatógenos, por lo que se considera como potenciales candidatos a ser utilizados en programas de control biológico de plagas que afectan la papa.

8. RECOMENDACIONES

1. Continuar la investigación con actinomicetos aislados de la rizósfera de *Solanum tuberosum* y su capacidad antagonista frente a otros fitopatógenos de la papa no evaluados en este estudio, pero que también sean de importancia fitosanitaria en el país.
2. Complementar el estudio de los actinomicetos productores de sustancias antifúngicas con la evaluación de la curva de crecimiento microbiano para encontrar el tiempo de desarrollo en cultivo donde produce la mayor cantidad de estos compuestos.
3. Evaluar extractos obtenidos con solventes de distinta polaridad con la finalidad de encontrar aquellos que muestren la mejor respuesta frente a hongos fitopatógenos de la papa.
4. Realizar estudios dirigidos a la separación e identificación de los compuestos bioactivos presentes en los extractos orgánicos obtenidos de actinomicetos con buena actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos de la papa, así como también determinar su mecanismo de acción con la finalidad de generar nuevos compuestos antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales.
5. Utilizar marcadores moleculares como la secuencia parcial del gen de la subunidad β del ARN polimerasa (rpoB) para la determinación de especies de actinomicetos.
6. Ensayar la preparación de inoculantes microbianos de actinomicetos con buen espectro de actividad antifúngica e inoculación en plantas de *Solanum tuberosum* a nivel de invernadero, con el fin de evaluar el efecto favorable *in vivo* frente a la infección por hongos fitopatógenos, así como otros posibles efectos favorables para las plantas como promotores de crecimiento vegetal directo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOYE, M. y BABALOLA, O. Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. En: MENDEZ-VILAS, A. (edit.). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex research center, 2013, p. 786-795. ISBN: 978-84-942134-0-3.

AGARWAL, A. y MATHUR, N. Thermophilic Actinomycetes are Potential Source of Novel Bioactive Compounds: A Review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2016, vol. 3, nº 2, p. 130-138.

AHMED, I.; LABUSCHAGNE, N. y KORSTEN, L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* and crown root of sorghum in Ethiopia. *Biological control*. 2007, vol. 40, p. 97-106.

ALAMA, I.; MALDONADO, E. y RODRÍGUEZ, E. *Lasiodiplodia theobromae* afectando el Cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalia*. 2006, vol. 11, nº 2, p. 4-13.

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. y LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997, vol. 2, nº 17, p. 3389-3402.

AMES, T. *Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y Tubérculos Andinos*. 1era ed. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1997. 172 p. ISBN: 92-9060-195-7.

ARASU, M.; DURAIPANDIYAN, V.; AGASTIAN, P. y IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale*. 2008, vol. 18, p. 147-153.

ARCE, F. *El cultivo de la patata*. 2da ed. Madrid: S.A. Mundi-prensa, 2002. 381 p. ISBN: 9788484760788.

- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2005, vol. 58, p. 1–26.
- CALVO, P.; REYMUNDO, L. y ZUÑIGA, D. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 2008, vol. 7, nº 1-2, p. 141-148.
- CALVO, P. y ZUÑIGA, D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*. 2010, vol. 9, nº 1, p. 31-39.
- CAMARGO, S.; GARCÍA, V. y MUCIÑO, R. ¿Qué es la fitopatología? Hongos fitopatógenos del crisantemo [*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev], un estudio de caso. *ContactoS*. 2000, vol. 37, p. 9-22.
- CANO, M. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 2011, vol. 14, nº 2, p. 15-31.
- CASTILLO, C. Efectividad de Actinomicetos Aislados de la Rizósfera de Papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2004, vol. 22, nº 2, p. 203-207.
- CASTRO, I. y CONTRERAS, A. *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de papa*. 1era ed. Valdivia: Imprenta Austral, 2011. 72 p. ISBN: 978-956-345-156-6.
- CHEREPENNIKOVA, M.; SAVENKOVA, L.; DOLGOVA, A.; SHAW, D. y DYAKOV, T. Vegetative Incompatibility of *Phytophthora infestans*. *J. Russian Phytopathol. Soc.* 2002, vol. 3, p. 19-32.
- CHOI, S.; SON, M.; KIM, S.; CHOI, S.; LEE, Y.; CHOI, J. y AN, G. Isolation and medium development of the actinomycetes, *Streptomyces griseofuscus* CNU-A91231, inhibiting phytopathogenic fungi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, vol. 37, nº 4, p. 322–332.

CONAM. *Perú: Estrategia Nacional sobre Diversidad Biológica*. 1era ed. Lima: VICEVERSA, 2001. 140 p. ISBN: 9972-824-07-1.

COOK, A. y MEYERS, P. Rapid identifications of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International J. of Systematic and Evolutionary Microbiol.* 2003, vol. 53, p. 1907-1915.

CRISTÓBAL, J.; NAVARRETE, Z.; HERRERA, E.; MIS, M.; TUN, J. y RUIZ, E. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Rev. Protección Veg.* 2013, vol. 28, n° 2, p. 138-144.

DÁVILA, M.; GALLEGOS, G.; HERNÁNDEZ, F.; OCHOA, Y. y FLORES, A. Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2013, vol. 4, n° 8, p. 1187-1196.

DEEPA, L.; GOWTHAMI, K. y KUMAR, K. In vivo screening of antimicrobial activity of soil actinomycetes against human pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2011, vol. 7, n° 5, p. 624-628.

DHANASEKARAN, D.; RAJAKUMAR, G.; SIVAMANI, P.; SELVAMANI, R.; PANNEERSELVAM, A. y THAJUDDIN, N. Screening of Salt Pans actinomycetes for antibacterial agents. *The Internet Journal of Microbiology*. 2005, vol. 1, n° 2, p. 6-12.

EZZIYYANI, M.; PÉREZ, C.; REQUENA, M.; SID, A. y CANDELA, M. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 2004, vol. 26, p. 61-68.

FARFÁN, D. y GUTIÉRREZ, C. “Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos”. Asesora: María Rodríguez. Tesis Titulo Profesional. Universidad Javeriana, Carrera de Microbiología Industrial, Bogotá, 2009.

FLÄRDH, K. y BUTTNER, M. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*. 2009, vol. 7, p. 36-49.

FONSECA, Y.; CASTELLANOS, D. y LEÓN, T. Efecto antagónico *in vitro* de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 2011, vol. 64, n° 2, p. 6111-6119.

FRANCO-CORREA M. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*. 2009, vol. 16, n° 2, p. 239-242.

FRANCO-CORREA, M.; QUINTANA, A.; DUQUE, C.; SUAREZ, C.; RODRIGUEZ, M. y BAREA, J. Evaluation of actinomycetes strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*. 2010, vol. 45, p. 209-217.

FRY, W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*. 2008, vol. 9, n° 3, p. 385-402.

GARCÍA, R.; GARCÍA, A. y GARNICA, C. Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 2002, vol. 13, p. 24-40.

GHANEM, N.; SABRY, S.; EL-SHERIF, Z. y ABU EL-ELA, G. Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 46, p. 105-111.

GONZALES-FRANCO, A. y HERNÁNDEZ, L. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *TECNOCIENCIA Chihuahua*. 2009, vol. 3, n° 2, p. 64-73.

GONZALES, Y. "Los actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal". Asesora: Marcela Franco-Correa. Tesis Titulo Profesional. Universidad Javeriana, Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Bogotá, 2010.

GOODFELLOW, M. y FIEDLER, H. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010, vol. 98, p. 119–142.

GOODFELLOW, M.; KAMPFER, P.; BUSSE, H.; TRUJILLO, M.; SUZUKI, K.; LUDWIG, W. y WHITMAN, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Five: The Actinobacteria*. 2nd ed. New York: Springer Science and Business Media, 2012. 2083 p. ISBN: 978-0-387-95043-3.

GUPTA, G.; SINGH, S.; KUMAR, N.; KUMAR, S. y SINGH V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microb. Biochem. Technol.* 2015, vol. 7, nº 2, p. 96-102.

HASANI, A.; KARIMINIK, A. y ISSAZADEH, K. Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2014, vol. 2, nº 1, p. 63-75.

HAYAKAWA, M.; YOSHIDA, Y. y LIMURA, Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, vol. 96, p. 973–981.

HISINGER, P.; BENGOUGH, A.; VETTERLEIN, D. y YOUNG, I. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil*. 2009, vol. 321, p. 117-152.

INTRA, B.; MUNGSUNTISUK, I.; NIHIRA, T.; IGARASHI, Y. y PANBANGRED, W. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC*

Research Notes [en línea]. 2011, vol. 4: 98, [Citado 13-07-2016]. Disponible en <<http://bmcrenotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-4-98>>

JUÁREZ, G.; SOSA, M. y LÓPEZ, A. Hongos fitopatógenos de alta importancia agrícola: descripción y métodos de control. *Temas selectos de alimentos*. 2010, vol. 4 nº 2, p. 14-23.

KATSIFAS, E.; KORAKI, T. y KARAGOUNI, A. Determination of metabolic activity of streptomycetes in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, vol. 89, p. 178-184.

KILLIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G. y HAIN, R. 2001. FZB24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*. 2001, vol. 1, p. 72-93.

KIM, B.; KIM, C.; CHUN, J.; KOH, Y.; LEE, S.; HYUN, J.; CHA, C. y KOOK, Y. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, vol. 54, p. 593–598.

KUMAR, P. y JAIN, P. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS1322. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2007, vol. 45, p. 203-206.

KUMAR, V.; BHARTI, A.; GUSAIN, O. y SINGH, G. Scanning Electron Microscopy of *Streptomyces* Without Use of Any Chemical Fixatives. *SCANNING*. 2011, vol. 33, p. 1-4.

LEIVA, S.; YÁÑEZ, M.; ZAROR, L.; RODRÍGUEZ, H. y GARCÍA, H. Actividad Antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile*. 2004, vol. 132, p. 151-159.

LEÓN, J.; LIZA, L.; SOTO, I.; CUADRA, D.; PATIÑO, L. y ZERPA, R. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 2007, vol. 14, nº 2, p. 259-270.

MALAGAMBA, P. Fisiología y manejo de tubérculos-semillas de papa. En: HIDALGO, H. (edit.). *Producción de tubérculos y semillas de papa*. Lima: Centro Internacional de la Papa, 1997, Fascículo 2.2: 1-15.

MANTECA, A. y SANCHEZ, J. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 2010, vol 1, p. 560–566.

MARÍN, M.; WONG, I.; GARCÍA, G.; MORÁN, R.; BASULTO, R.; PIMENTEL, E. y MENA, J. Actividad antagónica in vitro de *Tsukamurella paurometabola* C-924 frente a fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 2013, vol. 28, nº 2, p. 132-137.

MARÍN, R. “Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico”. Asesores: Oriana Salazar, María Lienqueo. Tesis Título Profesional. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Santiago de Chile, 2007.

MINISTERIO DE AGRICULTURA. *La papa nuestra de cada día*. 1era ed. Lima: OEEE, 2011. 13 p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. *Papa: Principales aspectos agroeconómicos*. 1era ed. Lima: CENDOC, 2013. 42 p.

MUHARRAM, M.; ABDELKADER, M. y ALQASOUMI, S. Antimicrobial activity of soil actinomycetes isolated from Alkharj, KSA. *International Research Journal of Microbiology*. 2013, vol. 4, nº 1, p. 12-20.

NIEBLA, A.; GONZALEZ, I. y VALLIN, C. Consideraciones actuales para la selección de actinomicetos productores de metabolitos novedosos. Nuevas tendencias de los

programas de tamizaje industrial. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2001, vol. 32, nº 1, p. 37-42.

OCAMPO, A. “Obtención de metabolitos secundarios obtenidos en fermentación líquida de una cepa nativa aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana”. Asesor: Jorge Robles. Tesis Título Profesional. Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, 2011.

OKELEYE, B.; SAMIE, A.; BESSONG, P.; MKWETSHANA, N.; GREEN, E.; CLARKE, A. y NDIP, R. Crude ethyl acetate extract of the stem bark of *Peltophorum africanum* (Sond, Fabaceae) possessing in vitro inhibitory and bactericidal activity against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, vol. 4, nº 14, p. 1432-1440.

OLANO, C.; MENDEZ, C. y SALAS, J. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar. Drugs*. 2009, vol. 7, p. 210–248.

PANDEY, A.; ALI, I.; SINGH, K.; CHATTERJI, T. y SINGH, V. Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011, vol. 2, nº 4, p. 384-392.

PÉREZ, F.; LEÓN, J. y GALINDO, N. Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes). *Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA*. 2015, vol. 33, nº 2, p. 116-139.

PETERS, J.; LEES, A.; CULLEN, D.; SULLIVAN, L.; STROUD, G. y CUNNINGTON, A. Characterization of *Fusarium* spp. responsible for causing dry rot of potato in Great Britain. *Plant Pathology*. 2008, vol. 57, p. 262-271.

PICOS, P.; GARCÍA, R.; LEÓN, J.; SAÑUDO, A. y ALLENDE R. *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2015, vol. 33, nº 1, p. 54-74.

QUIÑONES, E.; EVANGELISTA, Z. y RINCÓN, G. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*. 2016, vol. 101, p. 54-64.

RAMIREZ, F.; FOURNIER, M.; RUEPERT, C. y HIDALGO, C. Uso de agroquímicos en el Cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. *Agron. Mesoam*. 2014, vol. 25, nº 2, p. 337-345.

RAMÍREZ, P. y COHA, J. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 2003, vol. 10, nº 1, p. 67-77.

REINOSO, Y.; VAILLANT, D.; CASADESÚS, L.; GARCÍA, E. y PAZOS, V. Cepas de *Brevibacillus laterosporus* y *Brevibacillus brevis* antagonistas de bacterias y hongos fitopatógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*. 2007, vol. 11, nº 2, p. 79-80.

REMYA, M y VIJAYAKUMAR, R. Isolation and characterization of marine antagonistic Actinomycetes from West Coast of India. *Medicine and Biology*. 2008, vol.15, nº 1, p. 13-19.

RICO, M. "Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú". Asesor: Jorge León. Tesis Título profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2009.

RODRÍGUEZ, M. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 2001, número especial 1, p. 53-78.

RUIZ, C. "Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H. B. K., en tres estados fenológicos". Asesor: Elena Stashenko. Tesis Titulo Profesional. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Bucaramanga, 2008.

SADEGHI, A.; HESSAN, A.; ASKARI, H.; AGHIGHI, S. y SHAHIDI, G. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2006, vol. 9, nº 5, p. 904-910.

SAJITHA, K. y FLORENCE, E. Effects of *Streptomyces* sp. on growth of rubberwood sapstain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of Tropical Forest Sciencie*. 2013, vol. 25, nº 3, p. 393-399.

SALAZAR, A.; ORDOÑEZ, C.; HERNÁNDEZ, D.; CASTAÑO, L.; PEÑA, K.; RODRÍGUEZ, J. y BUENO, L. Actinomicetos aislados del suelo del Jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *Scenia et Technica*. 2014, vol. 19, nº 1, p. 223-229.

SÁNCHEZ, M.; SÁNCHEZ, S.; GALLEGOS, G. y SÁNCHEZ, A. Actividad Inhibitoria de Actinomicetos aislados de Hormigas Cultivadoras de Hongos (Hymenoptera: Formicidae) sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*. *Revista Agraria - Nueva Época*. 2011, vol. 8, nº 1, p. 14-17.

SELYANIN, V.; OBOROTOV, G.; ZENOVA, G. y ZVYAGINTSEV, D. Alkaliphilic Soil Actinomycetes. *Microbiology*. 2005, vol. 74, nº 6, p. 729-734.

SHARMA, H. y PARIHAR, L. Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2010, vol. 1, nº 10, p. 197-200.

SHARMA, M. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2014, vol. 3, nº 2, p. 801-832.

SHIRLING, E. y GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1966, vol. 16, nº 3, p. 313-340.

SINGH, S.; KUMAR, P.; GOLAPAN, N.; SHRIVASTAVA, B.; KUHAD, R. y SINGH, H. Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, p. S1147-S1150.

SMAOUI, S.; MATHIEU, F.; BEN, L.; MERLINA, G. y MELLOULI, L. Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an oasis in Tunis. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*. 2011, vol. 63, nº 4, p. 1047-1056.

SPANDARI, C.; ANTUNES, T.; TEIXEIRA, R.; MONOTTO, E.; FUENTEFRIA, A. y VAN DER SAND, S. Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. *Revista Brasileira de Biociencias*. 2013, vol. 11, nº 4, p. 439-443.

TADDEI, A.; RODRIGUEZ, M.; MARQUEZ-VILCHEZ, E. y CASTELLI, C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. *Microbiological Research*. 2006, vol. 161, p. 222-231.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. y KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013, vol. 30, nº 12, p. 2725–2729.

TAPIA, M. y FRIES M. *Guía de campo de los cultivos andinos*. 1era ed. Lima: FAO y ANPE, 2007. 222 p. ISBN: 978-92-5-305682-8.

TILAK, K.; RANGANAYAKI, N.; PAL, R.; SAXENA, K.; NAUTIYAL, S.; MITTAL, S.; TRIPATHI, A. y JOHRI, B. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 2005, vol. 89, p. 136-150.

TORRES, H. *Manual de las enfermedades más importantes de la Papa en el Perú*. 1era ed. Lima: Centro Internacional de la Papa, 2002. 68 p. ISBN: 92-9060-212-0.

TOVAR, J.; MORA, J.; NAVA, C.; TELIZ, D.; VILLEGAS, A. y LEYVA, S. Control de *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal de la muerte descendiente de injertos de zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn] en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013, vol. 36, nº 3, p. 233-238.

TSVAVKELOVA, E.; KLIMORA, S.; CHERDYNTSEVA, T. y NETRUSOV, A. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006, vol. 42, nº 2, p. 117–126.

UNALM. *Guía técnica Curso-taller Manejo Integrado de papa*. 1era ed. Lima: Agrobanco, 2011. 47 p.

VIMAL, B.; RAJAN, B. y KANNABIRAN, K. Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian Journal of Medical Sciences*. 2009, vol. 1, nº 2, p. 57-63.

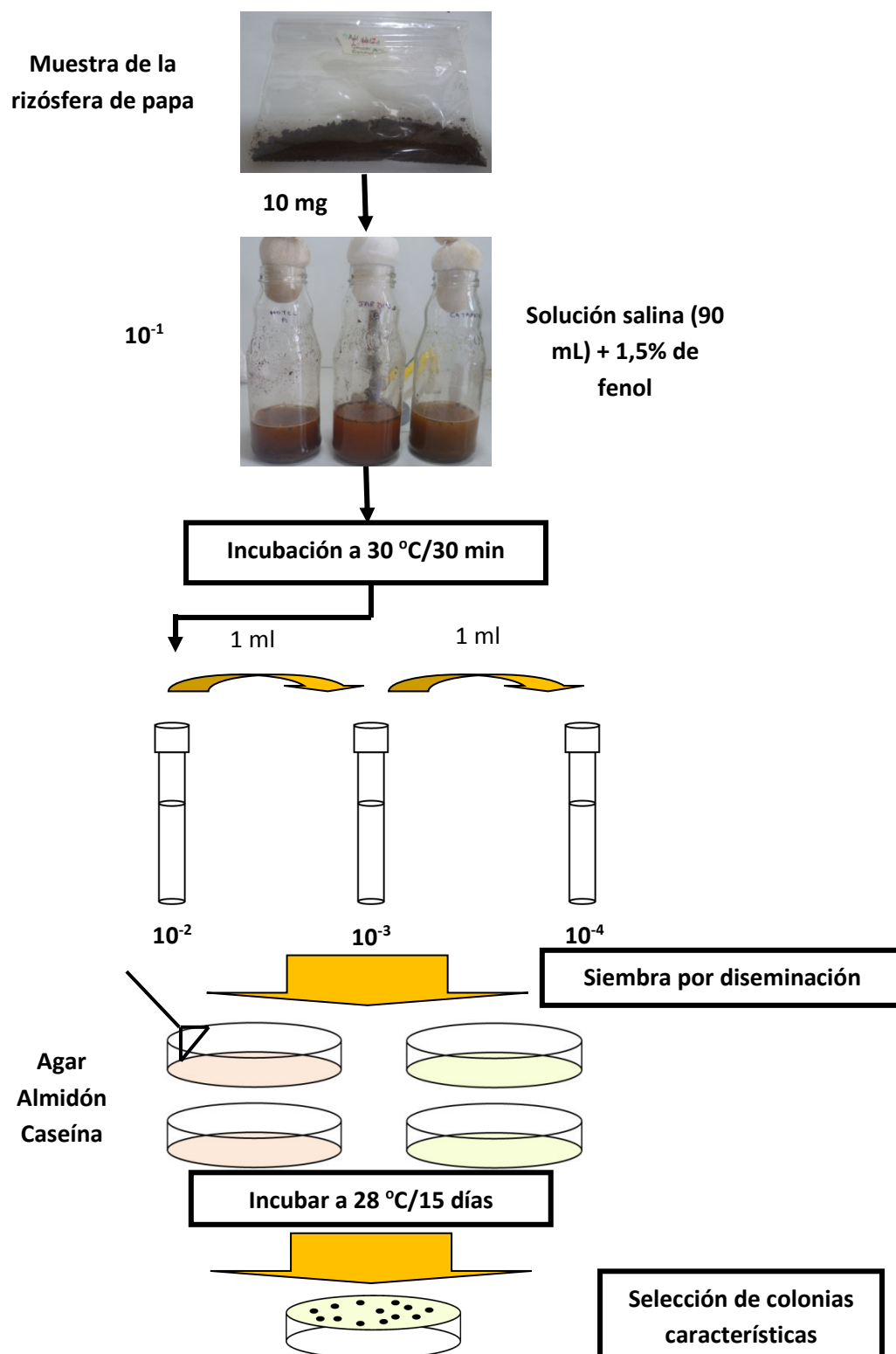
WATVE, M.; TICKOO, R.; JOG, M. y BHOLE, B. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 2001, vol. 176, p. 386-390.

WOODHALL, J.; LEES, A.; EDWARDS, S. y JENKINSON, P. Infection of potato by *Rhizoctonia solani*: effect of anastomosis group. *Plant Pathology*. 2008, vol. 57, p. 897-905.

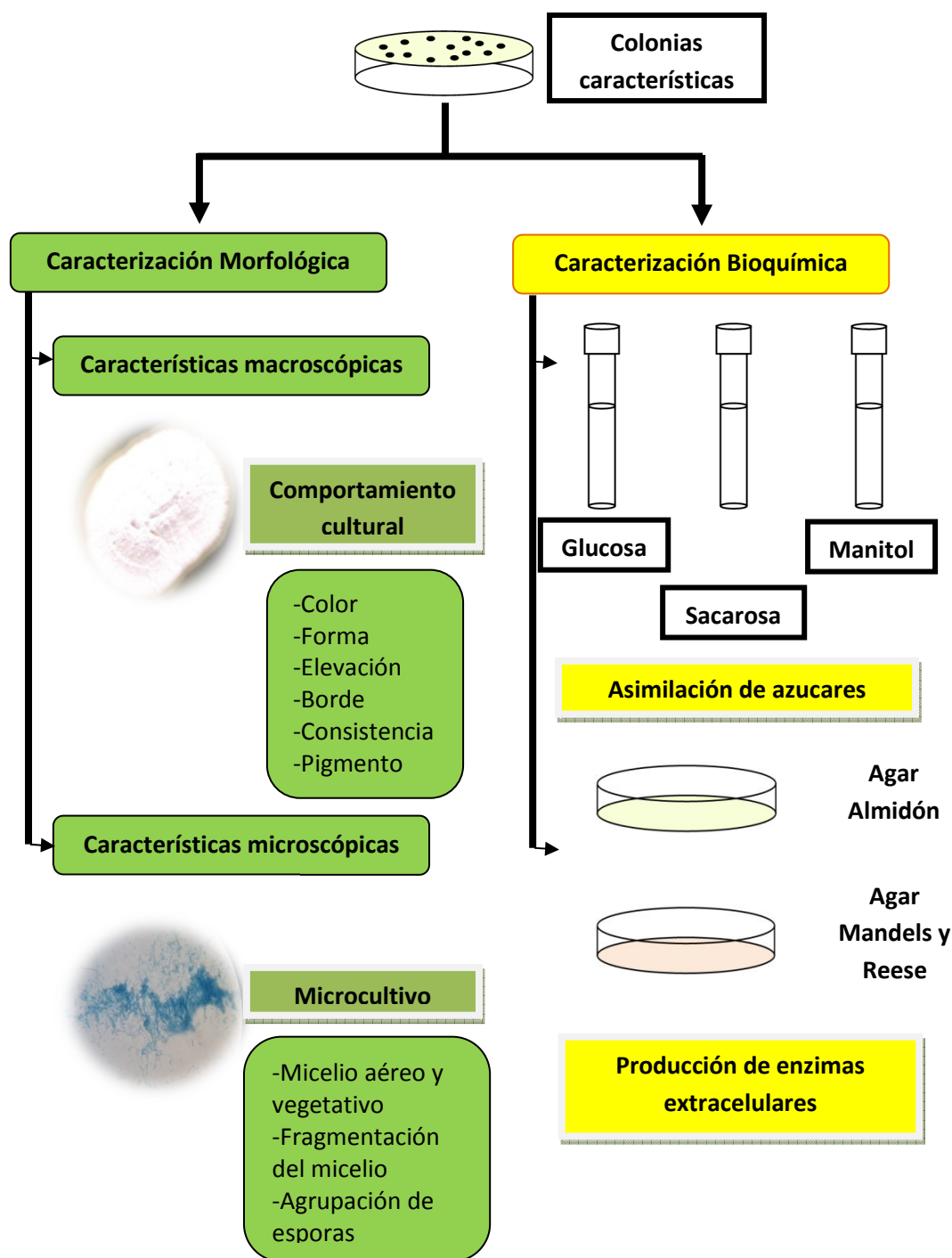
ZAKALYUKINA, Y.; ZENOVA, G. y ZVYAGINTSEV, D. Acidophilic Soil Actinomycetes. *Microbiology*. 2002, vol. 71, nº 3, p. 342-345.

10. ANEXOS

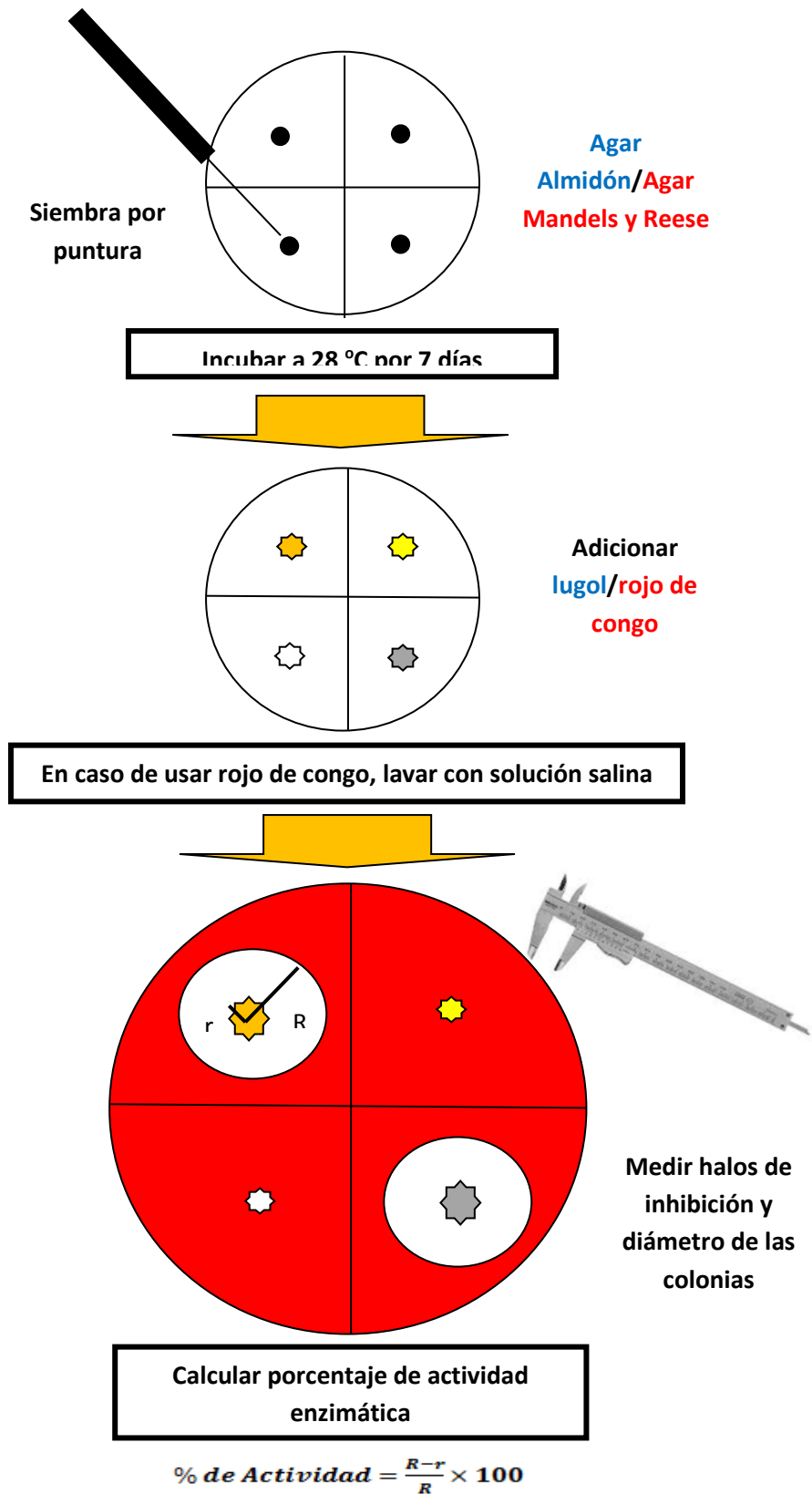
Anexo 1. Aislamiento y selección de actinomicetos de suelo



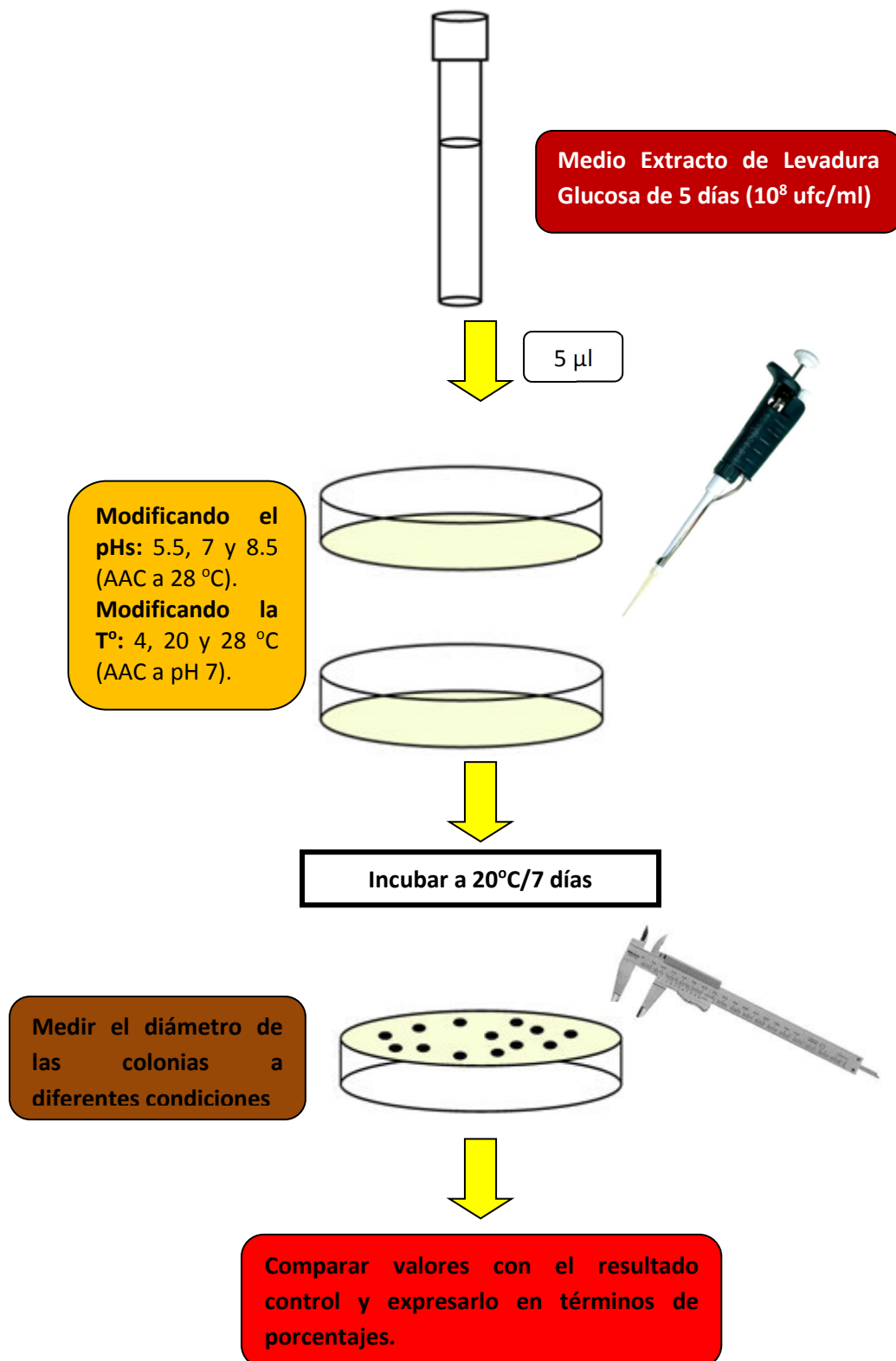
Anexo 2. Caracterización fenotípica de los actinomicetos aislados



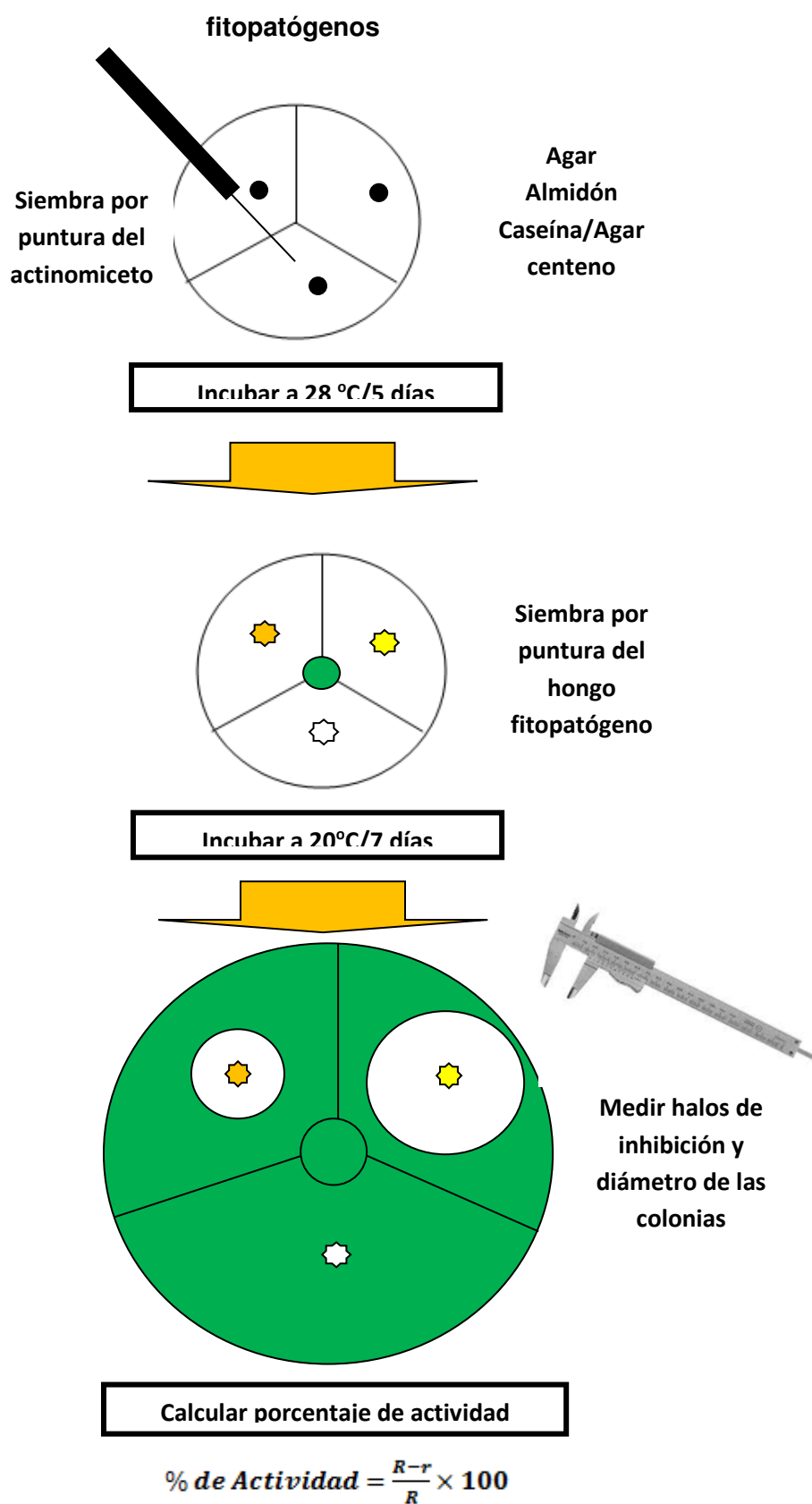
**Anexo 3. Caracterización fenotípica de los actinomicetos en función a la
producción de enzimas hidrolíticas**



Anexo 4. Caracterización fisiológica de los actinomicetos en función de la temperatura y pH



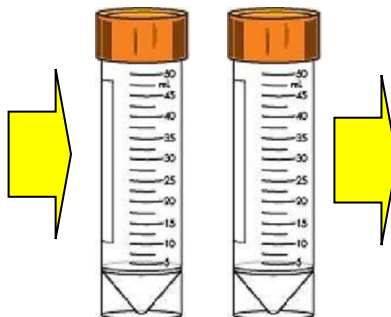
Anexo 5. Pruebas de antagonismo en placa de actinomicetos frente a hongos



Anexo 6: Obtención del extracto orgánico antimicrobiano y determinación de la actividad antifúngica



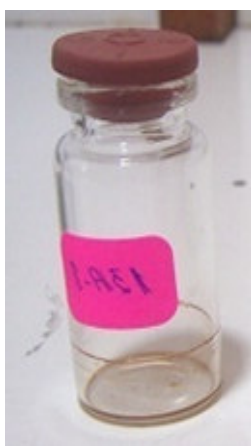
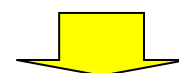
Fermentación en shaker
a 250 rpm/10 días



Centrifugar cultivo a
4000 rpm/25 min



Separar sobrenadante
y agregar solvente v/v



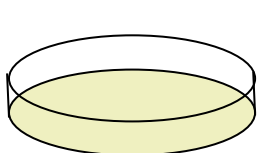
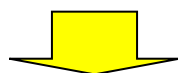
Pesar extracto
orgánico y



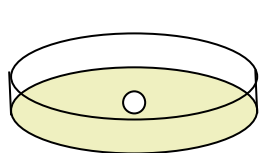
Evaporar con
rotavapor



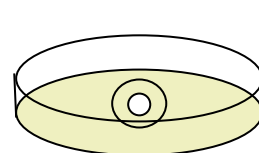
Separar solvente de la
fase acuosa



Sembrar el hongo
sobre APD



Realizar pocillos y
añadir extracto



Incubar por 5 días y
medir halo de inhibición

Anexo 7: Análisis del ADNr 16S de los actinomicetos



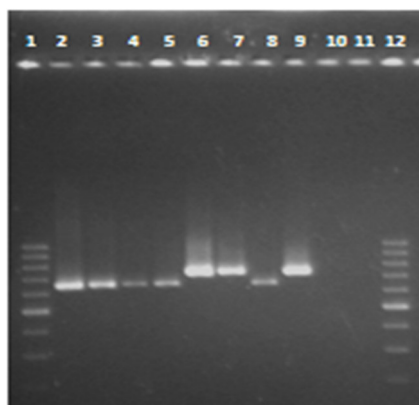
Cultivo puro del actinomiceto



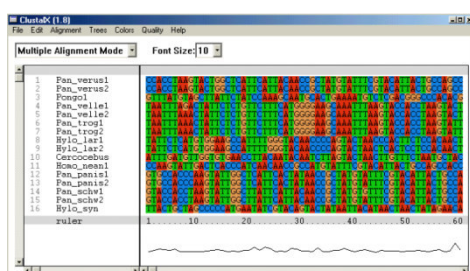
Extracción de ADN



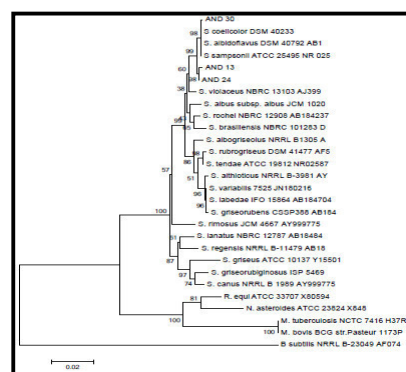
Amplificación por PCR



Electroforesis en gel de agarosa



Análisis de secuencias nucleotídicas



Análisis filogenético usando el ADNr 16S

**Anexo 8. Porcentajes de homología de 24 cepas de actinomicetos con la cepa
AND 24 realizado con la herramienta BLASTN**

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	S._sampsonii_ATCC_25495_(NR_025870.1)	2388	2388	100%	0.0	99%	Query_73218
<input type="checkbox"/>	S._coelicolor_DSM_40233_(NR_119342.1)	2385	2385	100%	0.0	99%	Query_73208
<input type="checkbox"/>	S._albidoflavus_NBRC_13010_(AB184255.1)	2385	2385	100%	0.0	99%	Query_73202
<input type="checkbox"/>	S._violatus_ISP_5209_(AJ399480.1)	2335	2335	100%	0.0	99%	Query_73221
<input type="checkbox"/>	S._rochei_NBRC_12908_(AB184237.1)	2290	2290	100%	0.0	98%	Query_73216
<input type="checkbox"/>	S._brasiliensis_NBRC_101283_(NR_041435.1)	2290	2290	100%	0.0	98%	Query_73206
<input type="checkbox"/>	S._tendae_ATCC_19812_(NR_025871.1)	2285	2285	100%	0.0	98%	Query_73219
<input type="checkbox"/>	S._albus_JCM_10204_(AB045884.1)	2285	2285	100%	0.0	98%	Query_73204
<input type="checkbox"/>	S._rubrogriseus_DSM_41477_(AF503501.1)	2263	2263	100%	0.0	98%	Query_73217
<input type="checkbox"/>	S._althoticus_NRRL_B-3981_(AY999791.1)	2259	2259	100%	0.0	98%	Query_73205
<input type="checkbox"/>	S._variabilis_strain_7525_(JN180216.1)	2257	2257	100%	0.0	98%	Query_73220
<input type="checkbox"/>	S._jabedae_NBRC_15864_(AB184704.1)	2257	2257	100%	0.0	98%	Query_73212
<input type="checkbox"/>	S._griseorubens_NBRC_12780_(AB184139.1)	2257	2257	100%	0.0	98%	Query_73209
<input type="checkbox"/>	S._albogriseolus_NRRL_B-1305T_(AJ494865.1)	2257	2257	100%	0.0	98%	Query_73203
<input type="checkbox"/>	S._rimosus_JCM_4667_(NR_024762.1)	2213	2213	100%	0.0	97%	Query_73215
<input type="checkbox"/>	S._regensis_NBRC_13448_(AB184410.1)	2191	2191	100%	0.0	97%	Query_73214
<input type="checkbox"/>	S._lanatus_NBRC_12787_(AB184845.1)	2185	2185	100%	0.0	97%	Query_73213
<input type="checkbox"/>	S._canus_NRRL_B-1989_(AY999775.1)	2141	2141	100%	0.0	96%	Query_73207
<input type="checkbox"/>	S._griseorubiginosus_NBRC_13047_(AB184276.2)	2124	2124	100%	0.0	96%	Query_73210
<input type="checkbox"/>	S._griseus_ATCC_10137_(Y15501.1)	2097	2097	100%	0.0	96%	Query_73211
<input type="checkbox"/>	R._equi_ATCC_33707_(X80594.1)	1784	1784	100%	0.0	91%	Query_73201
<input type="checkbox"/>	N._asteroides_ATCC_23824_(X84851.1)	1707	1707	100%	0.0	90%	Query_73200
<input type="checkbox"/>	M._tuberculosis_NCTC_7416_H37Rv_(X58890.1)	1554	1554	100%	0.0	88%	Query_73199
<input type="checkbox"/>	M._bovis_BCG_str_Pasteur_1173P2_(NR_074838.1)	1554	1554	100%	0.0	88%	Query_73198
<input type="checkbox"/>	B._subtilis_NRRL_B-23049_16S_(AF074970)	983	983	90%	0.0	82%	Query_73197

Anexo 9. Medios de cultivo

1. Agar Almidón Caseína (AAC) – mg/L (Kuster y Williams, 1964)

Almidón	10,0
Caseína	0,30
Nitrato de Potasio	2,00
NaCl	2,00
K ₂ HPO ₄	2,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CaCO ₃	0,02
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Agar	15,0
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,0

*Para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de actinomicetos.

2. Agar Papa Dextrosa (APD) – mg/L (Beever y Bollard, 1970)

Infusión de papa	4,0
D-glucosa	20,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000,0 ml
pH	5,5

*Para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de hongos.

3. Agar Centeno – mg/L (Caten y Jinks, 1968)

Harina de centeno	25,0
Sacarosa	20,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000,0 ml
pH	5,5

*Para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de *Phytophthora infestans*.

4. Agar Almidón – mg/L (Modificado por Achi y Nijoku, 1992)

Extracto de carne	3,0
NaCl	6,0
Almidón	2,0
Agar	15,0
Agua	1000,0 ml
pH	7,0

*Para la detección de la producción de amilasas.

5. Agar Carboximetilcelulosa – mg/L (Mandels y Reese, 1965)

Carboximetilcelulosa	10,0
K ₂ HPO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	2,0
Agar	15,0
Agua	1000,0 ml
pH	7,0

*Para la detección de la producción de celulasas.

6. Medio Extracto de Levadura Glucosa – mg/L (Modificado por Sultan *et al.*, 2002)

Extracto de levadura	1,0
Peptona de soya	4,0
D-glucosa	5,0
CaCO ₃	1,0**
Almidón	10,0**
Agua	1000,0 ml
pH	7,0

*Para la fermentación de actinomicetos.

** : Opcionales

Medios para la caracterización de especies de *Streptomyces* de acuerdo al “*International Streptomyces Project*”

7. Medio 1: Caldo Triptona-Extracto de levadura – mg/L (Pridham y Gottlieb, 1948)

Triptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,0-7,2

8. Medio 2: Agar Extracto de levadura-Extracto de malta - mg/L (Pridham *et al.* 1957)

Extracto de levadura	4,0
Extracto de malta	10,0
Glucosa	4,0
Agar	20,0
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,3

9. Medio 3: Agar Avena - mg/L (Kuster, 1959)

Avena	20,0
Agar	18,0
Solución de sales traza	1,0 ml
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,2

10. Medio 4: Agar Almidón-Sales inorgánicas mg/L (Kuster, 1959)

Almidón	10,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄	1,0
NaCl	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
CaCO ₃	2,0
Agar	20,0
Solución de sales traza	1,0 ml
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,0-7,4

11. Medio 5: Agar Glicerol-Asparragina - mg/L (Pridham y Lyons, 1961)

L-Asparragina	1,0
Glicerol	10,0
K ₂ HPO ₄	1,0
Agar	20,0
Solución de sales traza	1,0 ml
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,4

12. Medio 6: Agar Peptona hierro-Extracto de levadura – mg/L (Tresner y Danga, 1958)

Peptona	15,0
Proteosa peptona	5,0
Extracto de levadura	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
Citrato de amonio férrico	0,5
Na ₂ S ₂ O ₃	0,08
Agar	15,0
Agua	1000,0 ml
pH	7,0-7,2

13. Medio 7: Agar Tirosina – mg/L (Shinobu, 1958)

Glicerol	15,0
L-Tirosina	0,5
L-Asparragina	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,5
FeSO ₄	0,01
Agar	20,0
Solución de sales traza	1,0 ml
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,2-7,4

14. Medio 8: Caldo Nitrato – mg/L (Modificado por Skerman, 1967)

Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
KNO ₃	1,0
Agua destilada	1000,0 ml
pH	7,0

*Adicionar los reactivos de Griess A y B para la detección de reducción de nitratos.

15. Medio 9: Medio de utilización de carbohidratos - mg/L (Modificado por Pridham y Gottlieb, 1948)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64
KH ₂ PO ₄	2,38
K ₂ HPO ₄	5,65
MgSO ₄	1,0
Agar	15,0
Solución de carbohidrato	100 ml*
Sales traza de Pridham	1,0 ml
Agua destilada	900,0 ml
pH	6,8-7,0

*Agregar 10 g de carbohidrato en 100 ml de agua destilada.

16. Solución de sales traza – mg/L (Shinobu, 1958)

FeSO ₄	0,1
MnCl ₂	0,1
ZnSO ₄	0,1
Agua destilada	100,0 ml

*Para adicionar 1 ml a los medios 3,4, 5 y 7.

17. Sales traza de Pridham - mg/L (Pridham y Gottlieb, 1948)

CuSO ₄	0,64
FeSO ₄	0,11
MnCl ₂	0,79
ZnSO ₄	0,15
Agua destilada	1000,0 ml

*Para adicionar 1 ml al medio 9.